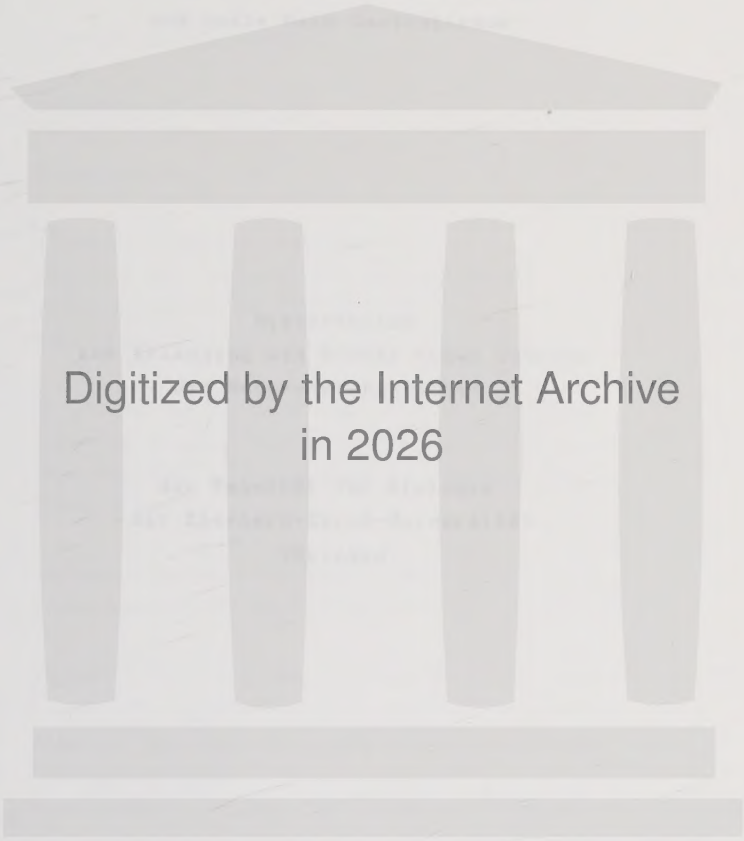
Gibberellin und Auxin: Regulation des Calciumhaushaltes und Rolle beim Geotropismus

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Andreas Leuschke
aus Trier

1986



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543903_0101

Gibberellin und Auxin: Regulation des Calciumhaushaltes und Rolle beim Geotropismus

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Andreas Leuschke
aus Trier

1986

Tag der mündlichen Prüfung	30.9.1986
Dekan	Prof. Dr. R. Hampp
1. Berichterstatter	Prof. Dr. A. Hager
2. Berichterstatter	Prof. Dr. B. Schwemmle

INHALTSVERZEICHNIS

A.	EINLEITUNG	1
B.	MATERIAL UND METHODEN	10
1.	Pflanzenmaterial	10
2.	Chemikalien	10
3.	Phenylalaninammoniumlyase	11
3.1.	Methode zur Messung der PAL-Aktivität	11
3.2.	Lokalisierung der PAL-Aktivität	12
3.3.	Vorinkubation der Hypokotylsegmente	13
4.	Methoden zur Messung der Calcium-Aufnahme	14
4.1.	Messung der Ca^{2+}-Aufnahme in intaktes Gewebe	14
4.2.	Messung der Ca^{2+}-Aufnahme in intrazelluläre Kompartimente	15
5.	Messung der geotropischen Reaktion und des Längenwachstums bei Hafer-Internodiensegmenten	16
6.	Methoden zur Messung von geotropischer Reaktion und Auxinverteilung in Haferkoleoptilen	18
6.1.	Messung der geotropischen Reaktion und des Längenwachstums	18
6.2.	Bestimmung von Auxin-Aufnahme und Transport	20

C. ERGEBNISSE 21

1. Kompetenz von Zucchinihypokotyl für Auxin und Gibberellin 21
1.1. Einfluß von Auxin, dem Auxinanalogon 2,4-D und Gibberellinsäure auf das Streckungswachstum 21
1.2. PAL-Aktivität: Lokalisierung und Abhängigkeit von Gibberellin 21
1.2.1. Lokalisierung der PAL-Aktivität 21
1.2.2. Einfluß von GA_3 und Licht auf die PAL-Aktivität 22

2. Calcium-Aufnahme in Hypokotylsegmente von Zucchini 24
2.1. Kinetik der Ca^{2+}-Aufnahme 24
2.2. Aufnahme von Ca^{2+} in Abhängigkeit von der GA_3-Konzentration 26
2.3. Einfluß von GA_3 auf die Ca^{2+}-Abgabe 27
2.4. Abhängigkeit der Ca^{2+}-Aufnahme von der Ca^{2+}-Konzentration 29
2.5. Lokalisierung des GA_3-Einflusses auf die Ca^{2+}-Aufnahme 31

3. Einfluß von Calcium auf die PAL-Aktivität 34

4. Haferinternodien: Streckungswachstum und Calciumaufnahme 35
4.1. Einfluß von Phytohormonen auf das Streckungswachstum 35
4.2. Ca^{2+}-Aufnahme in Abhängigkeit von GA_3 37
4.3. Der Einfluß der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration auf das Längenwachstum 39

5. Einfluß von Gibberellin und Auxin auf die geotropische Reaktion und das Längenwachstum 43

5.1. Geotropismus und Streckungswachstum bei Haferinternodien 43

5.2. Geotropismus, Streckungswachstum und Auxinverteilung bei Haferkoleoptilen 49

5.2.1. Geotropismus und Streckungswachstum 49

5.2.2. Aufnahme und Transport 55

D. DISKUSSION 58

E. ZUSAMMENFASSUNG 72

F. LITERATUR 74

A. EINLEITUNG

Pflanzen haben kein Nervensystem. Die interzelluläre Koordination zwischen den einzelnen Zellen, Geweben oder Organen wird nur durch Hormone gesteuert. Kennzeichnend für die Phytohormone Auxin, Gibberellin, Cytokinin, Abscisinsäure und Äthylen ist ein breites Wirkungsspektrum.

Trotz der Tatsache, daß man die Gibberelline durch ihren drastischen Effekt auf das Längenwachstum entdeckte, wurden nur langsam Ansätze zur Erklärung dieser Reaktion entwickelt (Jones, 1980). Während das Vorkommen und die physiologischen Wirkungen der Gibberelline erfaßt wurden, die Biosynthese ermittelt und die Chemie der verschiedenen Gibberelline aufgeklärt wurden (Jones, 1973; Dörffling, 1982), blieb die Kenntnis des Wirkungsmechanismus unvollkommen (Stoddart, 1982).

Die Ursache für diese Schwierigkeiten lagen unter anderem in dem Fehlen von passenden Testsystemen. Experimente wurden zum größten Teil mit ganzen Pflanzen und mit Segmenten durchgeführt, die nur ein geringes oder teilweise wenig spezifisches GA_3-induziertes Wachstum zeigten, weil das Wachstum auch eine Auxin-abhängige Komponente aufwies (Jones, 1980). In den vergangenen Jahren konnten diese Probleme verringert werden, indem man sich einfacheren Systemen zuwandte. Der Effekt ist dabei auf ein Gewebe oder einen zellulären Prozess beschränkt. Dieser Trend findet seinen Ausdruck in der Verwendug von Gersten-Aleurongewebe oder Salat-Hypokotylsegmenten (Stoddart, 1982). Weitere Testsysteme sind Hafer-Internodien (Adams et al., 1973) und künstliche Membransysteme (Wood und Paleg, 1972; Jusaitis et al., 1982).

Voraussetzung für die Primärwirkung der Phytohormone ist ihre Bindung an Rezeptorproteine. Aufgrund der ähnlichen chemischen Struktur von Gibberellinen und tierischen Steroidhormonen wird ein Modell diskutiert, nach dem das Hor-

mon, an ein cytoplasmatisches Rezeptorprotein gebunden, als Hormon-Rezeptor-Komplex in den Kern gelangt. Dort bindet dieser Komplex an das Chromatin und Nicht-Histon Proteine und führt qualitative und quantitative Veränderungen in der Transkription der DNA herbei (Stoddart, 1980). Zur Suche eines löslichen GA_3-Rezeptormoleküls wurden zahlreiche in vivo und in vitro Experimente unternommen, die die Spezifität der Bindung und die Affinität des Hormones zum Protein untersuchten. Eine Schwierigkeit war es, in Erbsen-Epikotylgewebe die bei in vivo Versuchen festgestellte Kompetition von ^3H-GA_1 mit biologisch aktiven Gibberellinen wie GA_1, GA_4, und GA_5 an der Bindungsstelle durch biologisch aktive Gibberelline bei in vitro Versuchen zu zeigen. Außerdem entsprach die in vitro gefundene Bindungskonstante nicht der aus der Dosis-Reaktionskurve bei der Induktion des Streckungswachstums (Keith und Srivastava, 1980; Stoddart, 1982). Eine reversible, sättigbare und durch biologisch aktive Gibberelline kompetitiv austauschbare Bindung von GA_4 konnte in vitro an ein lösliches Protein aus Gurkenhypokotylen gefunden werden (Keith und Foster, 1981).

Erschwert wird die Untersuchung der biologischen Aktivität der Gibberelline durch die schnelle Metabolisierung der Hormone in vielen Pflanzengeweben. So ist es nicht immer möglich, ohne weiteres zu entscheiden, ob das angebotene Hormon oder ein Umwandlungsprodukt die Reaktion bewirkt (Stoddart und Venis, 1980).

Der molekulare Wirkungsmechanismus der Gibberelline ist wohl am weitestgehendsten bei der Induktion der α-Amylase in der Gerstenkaryopse aufgeklärt. Erleichternd für die Analyse ist die Tatsache, daß die Aleuronschicht ein hochspezifisches Zielgewebe ist, das auf ein Gibberellinangebot scheinbar nur mit einer Reaktion antwortet, mit Enzymsynthese, und nicht wie viele andere Systeme mit Wachstum, das eine komplizierte Reaktion darstellt. Untersuchungen haben jedoch gezeigt, daß trotz des einfach erscheinenden Systems nicht geklärt werden konnte, auf welcher Ebene das Hormon ein-

greift und was die Primäreffekte sind. Wenige Minuten nach dem Hormonangebot ist die Exkretion löslicher Kohlenhydrate zu beobachten, die mit der Amylasebildung in keinem erkennbaren Zusammenhang steht. Ungefähr 3-4 Stunden nach der Gibberellinzufuhr ist die gesteigerte Bildung von ER nachweisbar. Weiterhin nimmt der Anteil ER-gebundener Polysomen zu und der RNA-Gehalt der Aleuronzellen ist erhöht (Dörffling, 1982; Baulcombe und Buffard, 1983).

Ein weiteres Enzym, dessen Aktivität durch GA_3 reguliert wird, ist die Phenylalaninammoniumlyase (PAL), ein Schlüsselenzym des Phenylpropanstoffwechsels (Heinzmann und Seitz, 1977; Zähringer et al., 1978). Phenole sind wichtige Bestandteile von Zellwänden, weil angenommen werden kann, daß sie durch die Bildung von Esterbindungen mit den Polysacchariden der Zellwand die Stabilität der Zellwand erhöhen (Fry, 1979).

Außer der α-Amylase und der PAL kennt man eine Reihe weiterer Enzyme, deren Aktivität durch GA_3 beeinflußt ist. Dabei gibt es jedoch nicht in jedem Fall so eindeutige Hinweise wie bei der Amylase in dem Gerstenaleurongewebe, daß GA_3 durch die Synthese von RNA die de novo Proteinsynthese bewirkt (Stoddart, 1972; González und Delsol, 1981).

Die Primärwirkung der Gibberelline, wie auch anderer Hormone, könnte ebenso von Membranen (Wood und Paleg, 1972) und möglicherweise Zellwänden (Moll und Jones, 1981) ausgehen.

Hertel (1983) formulierte zur Erklärung des Wirkungsmechanismus von Auxin eine Hypothese, nach der IAA-und Ca^{2+}-Transport eng verknüpfte Prozesse sind. Untersuchungen von dela Fuente (1984) an Sonnenblumenhypokotylen und von Sauter (1984) an Maiskoleoptilen geben ebenfalls Hinweise, daß es eine solche IAA-Ca^{2+} Wechselwirkung gibt. Der von dela Fuente (1984) und von Guzman und dela Fuente (1984) beschriebene Mechanismus der Hormon-Calcium Wechselwirkung scheint ähnlich abzulaufen wie Prozesse, die man von tieri-

schen Systemen her kennt (Vanderhoef und Kosuge, 1984). So konnte an ß-Zellen der Pankreas gezeigt werden, daß Glucose einen erhöhten Ca^{2+}-Einstrom in die Zelle bewirkt, der die Exocytose von Insulin auslöst (Matthew, 1979).

Auch bei Versuchen zur Aufklärung des Reaktionsmechanismus von GA_3 wurden vermehrt Anzeichen für die Bedeutung von Ca^{2+} bei GA_3-regulierten Prozessen gefunden.

Jones und Jacobsen (1983) zeigten an GA_3-inkubiertem Aleurongewebe von Gerste, daß der Entzug von Calcium aus dem Inkubationsmedium zu einer drastischen Reduzierung der Sekretion von α-Amylase führt. Dieses Ergebnis gibt Hinweise für die Existenz eines Ca^{2+}-abhängigen Sekretionsmechanismus in Pflanzen (Jones und Jacobsen, 1983; Jones und Carbonell, 1984; Vanderhoef und Kosuge, 1984).

Bei der Untersuchung des Wachstums von Salat-Hypokotylsegmenten stellten Moll und Jones (1981) fest, daß durch die Zugabe von $CaCl_2$ die Wachstumsrate verringert wurde. Diese Hemmung ließ sich sowohl durch eine Reduzierung des Ca^{2+}-Angebotes als auch durch Zugabe von GA_3 aufheben. Eine Veränderung des pH-Wertes von 5,5 nach 4,25 zeigte keinen Effekt auf das Wachstum des Gewebes. Das Wachstum ist nach Moll und Jones (1981) eine Funktion der Ca^{2+}-Konzentration der Zellwand, und GA_3 beeinflußt dieses Wachstum durch eine verstärkte Ca^{2+}-Aufnahme aus der Zellwand in die Zelle. Dies reduziert die Ca^{2+}-Konzentration in der Zellwand und verursacht eine Zunahme der Wachstumsrate. Hypothetisch läßt sich die Stabilität der Zellwand durch die Verknüpfung von Pektinmolekülen durch divalente Kationen wie Ca^{2+} und Mg^{2+} erklären. Ein Lösen dieser ionischen Bindungen erhöht die Extensibilität der Zellwand und ist die Voraussetzung für das Wachstum der Zelle.

Zur Erklärung der Zellstreckung wird häufig, vor allem bei Auxin-sensitivem Gewebe, die Säurewachstums-Hypothese herangezogen (Hager et al., 1971; Rayle und Cleland, 1977). Nach dieser Hypothese wird durch Auxin eine Ansäuerung des Zellwandraumes ausgelöst, die einerseits über ein Lösen von

Säure-labilen Bindungen oder das Aufbrechen nichtkovalenter Bindungen durch H^+, andererseits durch Aktivierung von Enzymen mit saurem pH-Optimum, zu einer Erhöhung der Extensibilität der Zellwand und damit zur Zellstreckung führt.

Um die Übertragbarkeit der Säurewachstums-Hypothese auf GA_3-induziertes Wachstum zu prüfen, wurden Versuche mit Salat-Hypokotylsegmenten und Avena Internodiensegmenten durchgeführt.

GA_3-induzierte Salat-Hypokotylsegmente zeigten keine Protonensekretion, obwohl unter bestimmten Bedingungen mit Fusicoccin eine Ansäuerung des Inkubationsmediums gemessen werden konnte. Das Säurewachstum ist im Vergleich mit GA_3-stimulierten Wachstum von kürzerer Dauer und induziert ungefähr nur 10 % des durch optimale GA_3-Konzentration hervorgerufenen Streckungswachstums. Aus den Ergebnissen kann man den Schluß ziehen, daß die Säurewachstums-Hypothese zur Erklärung des GA_3-induzierten Wachstums bei Salat nicht herangezogen werden kann (Stuart und Jones, 1978).

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen stehen teilweise Messungen an Hafer-Internodiensegmenten. Hebard et al. (1976) beobachteten in Gegenwart von GA_3 eine verstärkte Ansäuerung des Mediums. Der ähnliche Kurvenverlauf von Referenz und GA_3-behandelten Segmenten im "pH-Wachstums-Diagramm" deutet auf ein pH-abhängiges Wachstum hin, das jedoch nicht spezifisch für das GA_3-induzierte Wachstum ist. Der pH-Effekt ist maximal bei pH 5 in der Kontrolle und dem Ansatz mit GA_3. Der Einfluß von GA_3 kann nicht durch einen niedrigen pH-Wert imitiert werden. Die maximale Wachstumsreaktion bei pH 5 korrespondiert mit einer maximalen Enzymaktivität vieler Zellwand-Hydrolasen bei diesem pH-Wert.

Nachdem Muto und Miyachi (1977) und Anderson und Cormier (1978) den Nachweis für Calmodulin in Pflanzen erbrachten, erfuhren Ca^{2+}-abhängige Prozesse eine neue Bewertung. Daß in Tieren neben cAMP auch Ca^{2+} die regulatorische Funktion eines sekundären Botenstoffes übernehmen kann, wurde nach der Entdeckung des Calmodulins diskutiert (Marmé, 1981;

Cheung, 1982; Carafoli, 1986). Für das in Tieren und Pflanzen nachgewiesene cAMP wurde in Pflanzen bisher keine regulatorische Rolle als sekundärer messenger gefunden (Marmé, 1982; Salimath und Marmé, 1983).

Das prinzipielle Konzept von Calcium als "second messenger" geht davon aus, daß die Kontrolle des Wachstums und der Entwicklung oder irgendeiner Anpassung an eine veränderte Umwelt durch einen veränderten cytoplasmatischen Calciumspiegel vermittelt wird (Hanson, 1983; Berridge, 1985).

Während die gesamte Ca^{2+}-Konzentration in der Zelle so groß ist wie außerhalb der Zelle, ungefähr 10^{-3} M, ist die freie Ca^{2+}-Konzentration im Cytoplasma ungefähr 1.000-10.000 mal kleiner (ca. 10^{-7} M), weil das meiste Calcium in der Zelle gebunden oder in intrazellulären Kompartimenten gespeichert ist. Dies bedeutet, daß es zwischen dem Außenmedium und der Zelle, aber auch innerhalb der Zelle drastische Calciumgradienten gibt (Klumpp und Schultz, 1985).

Die Kontrolle und Regulation der freien cytoplasmatischen Calciumkonzentration ist eine notwendige Voraussetzung des "second messenger" Konzeptes in Pflanzen. Den zellulären Transportmechanismen kommt daher eine besondere Bedeutung zu, denn jede Änderung der Transporteigenschaften, bspw. durch Hormone, Licht und Schwerkraft, führt zu einer Änderung der freien cytoplasmatischen Ca^{2+}-Konzentration. Um die niedrige cytoplasmatische Ca^{2+}-Konzentration aufrecht zu erhalten, muß ständig Ca^{2+} aktiv gegen ein Konzentrationsgefälle aus dem Cytoplasma gepumpt werden (Marmé, 1983).

ATP-abhängige und Ca^{2+}-Calmodulin regulierte Ca^{2+}-Pumpen wurden an Plasmalemma-angereicherten Membranfraktionen (Gross und Marmé, 1978; Dieter und Marmé, 1980 a; Kubowicz et al., 1982) nachgewiesen. Weiterhin untersucht wurde der mitochondriale Ca^{2+}-Transport (Dieter und Marmé, 1980 b), der Ca^{2+}-Transport in Chloroplasten (Nobel, 1967), der ATP-abhängige Ca^{2+}-Transport am ER (Buckhout, 1983) und der aktive Ca^{2+}-Transport an Tonoplast-haltigen Membranfraktio-

nen (Gross, 1982).

Indem Calmodulin vier Ca^{2+}-Ionen bindet, ändert es seine Form und wird aktiviert. In diesem Zustand kann es eine Wechselwirkung mit Enzymen eingehen, die dadurch allosterisch gesteuert werden. In Pflanzen wurde eine Abhängigkeit der Regulation von Ca^{2+}-Calmodulin außer für die Ca^{2+}-Transport ATPase und die NAD-Kinase auch für membrangebundene Proteinkinasen festgestellt (Hetherington und Trewavas, 1982; Salimath und Marmé, 1983). Eine aktuelle Übersicht über die Rolle von Calcium, Ca^{2+}-Calmodulin regulierte Reaktionen und die Funktion von Ca^{2+} als sekundärer messenger in Pflanzen geben Hepler und Wayne (1985).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es festzustellen, ob in vivo GA_3 die Ca^{2+}-Aufnahme oder Abgabe beeinflußt und ob in der Zelle durch einen veränderten Ca^{2+}-Gehalt GA_3-regulierte Reaktionen vermittelt werden werden können.

Um sich veränderten Umweltbedingungen anzupassen, ist es für Pflanzen notwendig, Signale aus der Umwelt wahrzunehmen, zu verarbeiten und sinnvoll zu beantworten. Durch Wachstumskrümmungen können viele Pflanzen ihre Organe in einer bestimmten Richtung zur Erdbeschleunigung einstellen. Positiv geotropisch reagierende Organe wachsen in Richtung des Lotes zur Erdoberfläche. Negativ geotropisch wachsen die Pflanzenteile, die sich in die gegenüberliegende Richtung bewegen.

Der Schwerkraftreiz induziert bei horizontalen Sproßsegmenten unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeiten in der oberen und der unteren Segmenthälfte. In vielen Experimenten konnte gezeigt werden, daß das differentielle Wachstum auf eine Veränderung des Hormongehaltes zurückzuführen ist (Zur Übersicht siehe: Wilkins, 1979 und Halstead, 1984).

Die Hypothese, die hauptsächlich zur Erklärung der geotropischen Reaktion bei Sproß und Wurzel herangezogen wird, ist die von Cholodny (1927) und Went (1928). In Koleoptilen

konnte der postulierte Lateraltransport von Auxin eindeutig nachgewiesen werden (Brauner und Appel, 1960; Shaw et al., 1973).

Weiterhin wurde an geotropisch gereizten Haferkoleopilen eine Calciumumverteilung beobachtet (Slocum und Roux, 1983). Biro et al. (1982) zeigten ebenfalls an Avena Koleoptilen, daß der Calmodulin-Inhibitor Chlorpromazin die negativ geotropische Krümmung hemmt, ohne das Längenwachstum zu reduzieren. Dieses Resultat bekräftigt Hinweise, die für eine regulatorische Rolle von Calmodulin-abhängigen Ca^{2+}-Pumpen bei der geotropischen Reaktion sprechen. Untersuchungen an geotropisch gereizten Sonnenblumen-Hypokotylsegmenten (Wright and Rayle, 1983; Migliaccio und Rayle, 1984) deuten darauf hin, daß die Schwerkraftperzeption mit einer Auxinumverteilung und möglicherweise mit einer asymmetrischen Protonenabgabe verbunden sein könnte. Diese Daten stellen eine Beziehung zur Säurewachstums-Hypothese als Erklärungsansatz für das differentielle Wachstum geotropisch gereizter Sonnenblumen-Hypokotylen her.

Auch von geotropisch gereizten Wurzeln liegen Ergebnisse über Auxin-Calcium und Auxin-H^+ Wechselwirkungen vor (Mulkey et al., 1982; Lee und Evans, 1985). Das Hauptinteresse dieser Untersuchungen galt der Funktion von Auxin.

Daneben gibt es Hinweise, daß auch Gibberellinsäure eine wichtige Rolle bei der Regulation der geotropischen Reaktion spielt. Eine GA_3-Asymmetrie fanden Pharis et al. (1981) zwischen der oberen und der unteren Knotenhälfte in Haferpflanzen und Phillips (1972) in horizontalen Sonnenblumen-Sproßspitzen. Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß geotropisch gereizte Knoten von Haferpflanzen, denen man ^3H-GA_4 anbot, im Vergleich zu vertikalen die 5-fache Radioaktivität hatten und daß sich in den unteren Knotenhälften die Radioaktivität des angebotenen ^3H-GA_4 und von sauren Metaboliten konzentrierte, während in den oberen Hälften vor allem gebundene Metaboliten zu finden waren (Kaufman et al., 1979).

Dayanandan et al. (1976) zogen aus Versuchen an senk-

rechten Haferknoten den Schluß, daß GA_3 allein oder in Kombination mit IAA keinen Einfluß auf das Wachstum des Knotens hat.

Der vor allem an Koleoptilen beobachtete Lateraltransport von Auxin konnte bisher weder für Auxin noch für Gibberellinsäure in anderen geotropisch gereizten Gewebe eindeutig festgestellt werden (Kaufman et al., 1979; Mertens und Weiler, 1983; Halstead, 1984). Die Hypothese von Cholodny und Went erscheint nicht ausreichend, um allgemein bei Pflanzen geotropische Reaktionen zu erklären (Mertens und Weiler, 1983).

In Haferknoten konnte, wie bereits dargestellt, an geotropisch gereizten Internodien eine Asymmetrie von Gibberellinsäure, aber keine Beeinflußung des Knotenwachstums durch GA_3 an vertikalen Knoten gemessen werden. Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Einfluß von GA_3 auf die durch Auxin reduzierte geotropische Krümmung von Haferinternodien untersucht. Weiterhin wurde geprüft, ob das differentielle Wachstum geotropisch gereizter Avena Koleoptilen ein Optimumverhalten bezüglich des äußeren Auxinangebotes zeigt, wie es Tietze-Haß und Dörffling (1977) beobachteten.

B. MATERIAL UND METHODEN

1. Pflanzenmaterial

Zucchinisamen, Cucurbita pepo L. cv. Cocozelle v. Tripolis, wurden von der Samenhandlung Küpper, Eschwege bezogen.

Hafersamen, Avena sativa L. var. Sieges I, stammten von der Firma Svalöf AB, Svalöv, Schweden.

Zucchinikeimlinge wurden für 5 Tage bei 26°C, schwachem Grünlicht und täglich 2 Stunden Hellrotlicht auf wassergetränktem Zellstoff angezogen. Für die Versuche mit Haferinternodien wurden Hafersamen in Erde ausgesät. Die Pflanzen wuchsen unter Gewächshausbedingungen (23°C, 18 h Licht) 4-6 Wochen. Bei allen Pflanzen wurde auf einen senkrechten Wuchs der Sproßachse geachtet, der besonders für Pflanzenmaterial Voraussetzung war, das in Versuchen zur Messung der geotropischen Reaktion verwendet wurde.

Haferkeimlinge zur Gewinnung von Koleoptilen, die in Geotropismus- und Wachstumstests eingesetzt wurden, waren 5-6 Tage bei 23°C im Dunkeln auf wassergetränktem Zellstoff und Sägespänen gewachsen.

2. Chemikalien

Amersham Buchler, Braunschweig
$^{45}CaCl_2$ (10 mCi/ml; 99 % rein)
^{14}C-IAA (50 µCi/ml mit 54 mCi/mol)

Calbiochem, Gießen
A 23187

Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA
Difco Bacto Agar

EGA-Chemie, Steinheim
1-NAA

Fluka, Buchs, Schweiz
EGTA

Merck, Darmstadt
GA_3

Serva, Heidelberg
IAA
2,4-D
L-Phenylalanin

Sigma Chemie, München
2-NAA
X-537A

Zinsser, Frankfurt
Tissue Solubiliser TS-1
Unisolve

3. Phenylalaninammoniumlyase

3.1. Methode zur Messung der PAL

Die Bestimmung der Phenylalaninammoniumlyase (PAL) Aktivität wurde bei Zucchini-Hypokotylsegmenten durchgeführt, die aus dem Bereich von ungefähr 7-35 mm unterhalb der Kotyledonen stammten.

Das Gewebe wurde in Na-Phosphatpuffer (100 mM, pH 8,0) homogenisiert. Das Homogenat wurde für 10 min bei 2000 x g vorzentrifugiert, das Pellet wurde verworfen.

Die PAL-Aktivität wurde auf der Grundlage des photometrischen Tests von Zucker (1965) bestimmt. Der Test beruht auf der Umsetzung von L-Phenylalanin durch das Enzym PAL zu trans-Zimtsäure. Das Reaktionsmedium enthielt 20 mM L-Phenylalanin in 33,3 mM H_3BO_4-NaOH, pH 8,8. Das Protein des aufgearbeiteten Probenmaterials wurde mit dem Reaktionsmedium bei 36°C inkubiert. In definierten Zeitabständen wurde die Bildung der trans-Zimtsäure durch Messung der Absorptionsdifferenz bei 290 und 310 nm bestimmt.

Die Messung des Proteingehaltes in den Homogenaten erfolgte nach der Methode von Bradford (1976), die auf der Bildung eines Farbstoffkomplexes von Coomassie Brilliant Blue G mit Polypeptiden basiert. Der Komplex hat ein Absorptionsmaximum bei 595 nm.

3.2. Lokalisierung der PAL-Aktivität

Die Zucchini-Hypokotylsegmente wurden pro g Frischgewicht mit 2,5 ml 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 8 versetzt. Das Homogenat wurde durch einen Nylonfilter (100 µm) filtriert. Das Filtrat wurde bei 2000 x g für 10 Minuten zentrifugiert, der erhaltene Überstand wurde bei 50.000 x g für 20 Minuten noch einmal zentrifugiert. Die PAL-Aktivität wurde in den Überständen gemessen.

Aus Tab. 1 geht die Proportionalität von Enzymaktivität und eingesetzter Proteinmenge hervor. Die Daten zeigen, daß im Bereich niedriger Proteinkonzentrationen Proportionalität zwischen Protein- und Produktkonzentration besteht. Bei hohen Proteinkonzentrationen stellt man eine Abweichung von der Proportionalität fest. Für die routinemäßige Enzymbestimmung wurde eine Proteinkonzentration von 250 µg/ml Testmedium eingesetzt.

Protein-konzentration [$\mu g \cdot ml^{-1}$]	100	250	500	750
Spezifische PAL-Aktivität [$nmol \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$]	0,30	0,29	0,37	0,26

Tab. 1: Proportionalität zwischen eingesetzter Proteinkonzentration und spezifischer PAL-Aktivität. Die Enzymaktivität wurde im Überstand der 50.000 x g Fraktion bestimmt.

3.3. Vorinkubation der Hypokotylsegmente mit GA_3

Je 5 g von 5 mm langen Zucchinisegmenten wurden in 50 ml 0,1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 6 bei 20°C und 3500 Lux auf einem Rundschüttler inkubiert. GA_3 wurde in Ethanol gelöst. Die Testansätze enthielten 10 µM GA_3, Proben ohne GA_3 die gleiche Konzentration Ethanol (0,1 %). Dunkelproben wurden mit Aluminiumfolie abgedeckt.

Nachdem die Segmente mit einem Sieb aus dem Inkubationsmedium entnommen wurden, erfolgte die Aufarbeitung des Gewebes nach 1,5 h oder 24 h Inkubation wie bereits dargestellt.

Um die intrazelluläre Calciumkonzentration zu erniedrigen, wurde den Segmenten in einem calciumfreien Puffer 1 mM EGTA und 10 nM A 23187 zugesetzt.

Die Versuchsansätze bestanden jeweils aus 5 g Zucchinisegmente in 50 ml 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,0. Nach 15 h Inkubation wurden die Segmente dem Inkubationsmedium entnommen. Der Aufschluß des Gewebes erfolgte wie in Kap. 3.2. dargestellt. Die PAL-Aktivität wurde im Überstand der mikrosomalen Fraktion (50.000 x g für 20 Minuten) bestimmt.

4. Methoden zur Messung der Calcium-Aufnahme

4.1. Messung der Ca^{2+}-Aufnahme in intaktes Gewebe

Die in den Versuchen eingesetzten 5mm langen Hypokotylsegmente stammten aus dem Bereich 5-30 mm unterhalb des Hypokotylhakens. Kurze Segmente bieten im Verhältnis zur gesamten Segmentoberfläche einen großen Schnittflächenanteil, der den Ionenaustausch mit dem Gewebe erleichtert.

Das Inkubationsmedium für die Segmente war, wenn nicht anders erwähnt, ein 10 mM MES-NaOH Puffer, pH 6, mit 2 mM KCl, 3 mM $MgCl_2$, 100 µM $CaCl_2$ und 2 % (w/w) Saccharose (Puffer 1) mit oder ohne Gibberellinsäure. Die Konzentration an $^{45}Ca^{2+}$ war in jedem Experiment gegenüber der zugesetzten, nicht markierten $CaCl_2$-Konzentration vernachlässigbar gering.

Es wurden je 8 Segmente entnommen, um die Messung statistisch abzusichern. Die Segmente wurden jeweils unmittelbar nach der Entnahme aus dem Inkubationsmedium 2 mal mit je 5 ml Puffer gewaschen und abgesaugt, so daß oberflächlich anhaftendes Calcium entfernt wurde. Zur Messung der Radioaktivität war es notwendig, das Gewebe mit einem Zellauflöser zu behandeln. Je 8 Segmenten wurde 1 ml Zellauflöser zugesetzt. Nach ungefähr 24 h bei 50°C wurde der alkalische Zellauflöser mit Essigsäure neutralisiert.

Ungefähr 5 isolierte Internodien wurden in 2,0 ml 10 mM MES-NaOH, pH 6,0 mit 10 mM KCl, 3 mM $MgCl_2$, 100 µM $CaCl_2$, 66.000 cpm $^{45}Ca^{2+}$ und 2 % (w/w) Saccharose, gegebenenfalls mit 30 µM GA_3, inkubiert. Nach 14 h wurden die Segmente entnommen und 2 mal mit je 5 ml 10 mM MES-NaOH Puffer, pH 6,0 gewaschen.

Es erfolgte die Messung der Masse und der Länge der einzelnen Segmente. Die Länge wurde durch Auswertung von Photokopien der Segmente ermittelt. Danach wurden die Segmente mit Zellauflöser behandelt und die Radioaktivität bestimmt.

4.2. Messung der Ca^{2+}-Aufnahme in intrazelluläre Kompartimente

Ein großer Teil des von den Segmenten aufgenommenen Calciums befindet sich in der Zellwand. Dieser Anteil kann durch EGTA entfernt werden. Um den Einfluß von GA_3 auf die Ca^{2+}-Aufnahme in verschiedene Zellkompartimente zu untersuchen, wurde folgende Versuchsdurchführung gewählt.

Für das Experiment wurden 2 Ansätze mit je 5 g Zucchini-Hypokotylsegmenten verwendet. Von dem Inkubationsmedium mit 10.000 cpm ^{45}Ca/ml wurden jedem Ansatz 50 ml Puffer zugegeben. Der Testansatz enthielt 10 µM GA_3. Nach 3,25 h Inkubation wurden Puffer und Segmente mit einem Sieb getrennt. Die Segmente wurden je in 5 ml Puffer 2 mit 10 % (w/w) Saccharose auf Eis jeweils 5 Minuten mit einer Rasierklinge zerhackt. Der Aufschlußgrad betrug in der Versuchsreihe zwischen 60 % und 80 %. Das Homogenat wurde durch ein Nylonfilter (100 µm) filtriert. Der Rückstand wurde verworfen. Für die Messung der Radioaktivität des Rohhomogenates wurde 1 ml verwendet.

Jeweils 7 ml des Rohhomogenates wurden bei 1000 x g für 5 Minuten vorzentrifugiert. Das Pellet, das ganze Zellen, Zellwandbestandteile und Zellkerne enthielt, wurde in 1 ml Puffer 2 resuspendiert und die Radioaktivität bestimmt. 5 ml des Überstandes wurden bei 50.000 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde ebenfalls in 1 ml Puffer 2 resuspendiert und die Radioaktivität bestimmt. Von den Überständen wurde jeweils 1 ml zur Messung der Radioaktivität eingesetzt.

Zur Messung des aus den verschiedenen Kompartimenten freisetzbaren Ca^{2+}-Gehaltes wurden die folgenden Aufarbeitungsschritte durchgeführt. Die Inkubation und Extraktion der Zucchini-Hypokotylsegmente erfolgte wie bereits beschrieben.

Nach der Vorinkubation des Rohhomogenates bei 1000 x g für 5 Minuten wurde der Überstand bei 3000 x g für

10 Minuten zentrifugiert. Man kann davon ausgehen, daß in diesem Pellet vor allem Plastiden enthalten sind. Der Überstand wurde bei 12.000 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Das Pellet dieses Zentrifugationsschrittes enthält einen besonders hohen Anteil von Mitochondrien. Im Überstand und im resuspendierten Pellet wurde die Radioaktivität bestimmt.

Um frei in den Organellen enthaltenes Ca^{2+} von dem gebundenem Calcium unterscheiden zu können, wurde ein Teil des in 2,5 ml Puffer 2 mit 10 % (w/w) resuspendierten Pellets mit 10 µM X-537A, der andere ohne X-537A inkubiert. In der Probe mit X-537A wird nach erneuter Zentrifugation im Pellet gebundenes Ca^{2+} und im Überstand sowohl unspezifisch als auch durch X-537A freigesetztes Ca^{2+} erfaßt. Die Probe ohne X-537A zeigt im Pellet den Membran-assoziierten und den freien und im Überstand den unspezifisch, auch ohne Einsatz des Ionophors ausströmenden Anteil des Gesamtcalciumgehaltes der Probe.

5. Messung der geotropischen Reaktion und des Längenwachstums bei Hafer-Internodiensegmenten

Hafer-Internodiensegmente bestehen aus drei morphologischen Untereinheiten: dem Knoten, dem Internodium und dem umgebenden Blattschaft. Das Internodium enthält an der Basis das interkalare Meristem. In den folgenden Versuchen wurden "isolierte Internodien" verwendet. Das waren Segmente, von denen Blattschaft und Knoten abgetrennt wurden, die aber mit dem interkalaren Meristem und den davon gebildeten embryonalen Zellen das GA_3-sensitive Gewebe noch hatten.

In allen Versuchen wurden ausschließlich solche Segmente eingesetzt (p-1 internode), die aus dem Bereich zwischen Blütenknoten (peduncular node) und dem ersten Knoten (p-1 node) stammten.

Weil aus jeder Haferpflanze nur ein Segment entnommen werden konnte, und die Pflanzen bis zum Versuchseinsatz 4-6

Wochen alt waren, wurde zur Standardisierung der Segmentauswahl die Länge des p-1 Internodiums als Maß für den Entwicklungszustand der Pflanze herangezogen. In der Regel wurden für die Versuchsansätze gleich alte p-1 Internodien ausgewählt, die in der Pflanze zwischen 2-4 cm lang waren. Segmente für die Wachstumstests wurden auf eine Länge von 10 mm geschnitten.

Für die Untersuchung der geotropischen Reaktion von Hafer-Internodiensegmenten wurden ausschließlich solche Segmente benutzt, die den ersten Knoten (p-1 Knoten) unterhalb des Blütenknotens noch enthielten. Der Knoten enthält das geotropisch sensitive Gewebe. Wichtige Voraussetzung für die quantitative Bestimmung der geotropischen Krümmung und die Vergleichbarkeit der in den Einzelansätzen erhaltenen Daten war es, sowohl eine Standardisierung der Segmentauswahl als auch der Segmentbefestigung zu erreichen. Um von einheitlichem Material ausgehen zu können, wurden für jede Versuchsreihe Pflanzen ausgesucht, deren erste Internodien (p-1 Internodien) zwischen 1,5-3,0 cm lang waren. Bedingt durch die Abmessungen der Segmenthalterung konnten nur Segmente mit bestimmten Durchmessern verwendet werden.

Zur Bestimmung des Krümmungswinkels wurden die Segmente an dem basalen Ende (p-2 Internodium) fixiert, während das 10 mm lange p-1 Internodium und der zugehörige p-1 Knoten frei beweglich waren (Abb. 1).

Die Segmente wurden bei Dunkelheit in calciumfreiem Puffer 1 inkubiert. Der Puffer bedeckte die Segmente nicht vollständig, so daß keine anaeroben Bedingungen vorhanden waren. Völlig untergetauchte Segmente zeigten keine geotropische Reaktion. Die Hormone waren in einer ethanolischen Stammlösung. Die Kontrollansätze ohne Hormon erhielten die gleiche Konzentration Ethanol.

Die Messung der geotropischen Krümmung und des Längenzuwachses erfolgte nach Abschluß des Experimentes durch Auswertung von Photokopien der Segmente mit Winkelmesser und Lineal. Bestimmt wurde der Winkel, den das frei bewegliche

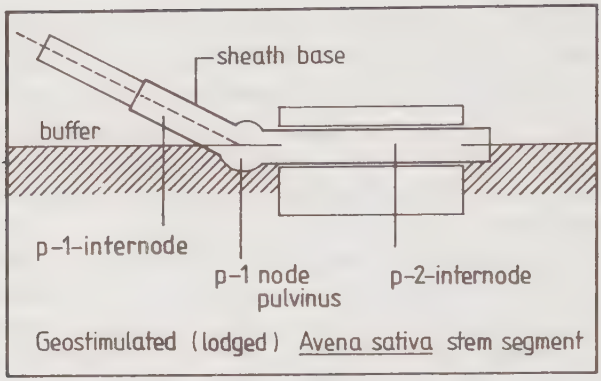


Abb. 1: Fixierung für Hafer-Internodiensegmente. Die Anordnung diente der Bestimmung der geotropischen Reaktion.

p-1 Internodium mit dem fixierten p-2 Internodium bildet (Abb. 1). Der Zuwachs des p-1 Internodiums war der Anteil des Segmentes, der über den Blattschaft hinausgewachsen war. Der Blattschaft zeigte kein Wachstum.

6. Methoden zur Messung von geotropischer Reaktion und Auxinverteilung in Haferkoleoptilen

6.1. Messung der geotropischen Reaktion und des Längenwachstums

In den Versuchen wurden 20 mm lange dekapitierte Koleoptilsegmente von Hafer eingesetzt, die aus dem Bereich von 5-25 mm unterhalb der Spitze stammten.

Die Donoren, die auch die Funktion der Koleoptilfixierung hatten, waren in allen Versuchen Agarblöcke mit den Maßen 10 x 5 x 4 mm^3 aus 1,5 % Agar in Puffer. Die Kontrolle ohne

Auxin bestand ausschließlich aus einem 30 mM MES-NaOH Puffer, pH 6,5 mit 3 mM $MgCl_2$, 3 mM KCl und 2 % (w/w) Saccharose (Puffer 3). Die Auxinstammlösung enthielt 1 mM IAA gelöst in Puffer 3. Die verschiedenen Auxinkonzentrationen wurden aus dieser Stammlösung durch verdünnen mit Puffer 3 hergestellt. Bei Zugabe von Gibberellinsäure aus einer ethanolischen Stammlösung wurde die Kontrolle mit der gleichen Konzentration Ethanol versetzt. Die maximale Ethanolkonzentration betrug 1 %.

Für den Geotropismustest wurden die Koleptilsegmente in horizontaler Richtung im Agar befestigt. Wegen des polar basipetalen Transportes von IAA wurde der Donor am apikalen Ende der Hafer Koleoptile angebracht. 5 Agarblöcke mit Koleoptilen waren auf einem Objektträger aufgebaut.

Aus dem gleichen Agar, mit Gibberellinsäure oder verschiedenen Auxinkonzentrationen versetzt, wurden sowohl die Donoren für den Geotropismustest als auch für den Wachstumstest hergestellt. Für den Wachstumstest wurden dekapitierte 20 mm lange Koleoptilsegmente mit dem apikalen Ende nach oben in jeweils 200 µl Agar fixiert. Um die Segmente und die Agarblöcke vor Austrocknung zu schützen, wurden die Versuchsanordnungen in einer feuchtigkeitsgesättigten Kammer aufbewahrt.

Nach einer Inkubation, die in der Regel zwischen 16-24 h dauerte erfolgte die Auswertung an Photokopien der Segmente mit Winkelmesser und Lineal. Die geotropische Reaktion wurde aus dem Winkel bestimmt, den eine an das frei bewegliche basale Ende angelegte Tangente mit dem apikalen Ende bildet. Zur Bestimmung des Einflusses der Hormone auf das Längenwachstum wurde der Zuwachs der Segmente gemessen.

6.2. Bestimmung von Auxin-Aufnahme und -Transport

Die Materialauswahl und die Versuchsdurchführung erfolgten wie bereits beschrieben. Zur Messung der Auxinaufnahme und des Transportes wurden jedem Donor (200 µl) 10^6 cpm ^{14}C-IAA zugesetzt. Die Kontrolle enthielt ausschließlich markiertes Auxin (3,83 µM), der Testansatz zusätzlich noch 1 mM nicht markierte IAA.

Nach 8 h und 24 h Inkubationszeit wurden die Koleoptilen von den Donoren getrennt und, beginnend am apikalen Ende, in 3 oder 5 mm lange Segmente zerschnitten. Es wurde die in den Segmenten und im Donor enthaltene Radioaktivität gemessen.

C. ERGEBNISSE

1. Kompetenz von Zucchinihypokotyl für Auxin und Gibberellin

1.1. Einfluß von Auxin, dem Auxinanalogon 2,4-D und Gibberellinsäure auf das Streckungswachstum

Voruntersuchungen mit Zucchini-Hypokotylsegmenten zeigten, daß mit zunehmendem Abstand von den Kotyledonen das Längenwachstum signifikant abnimmt. Deshalb wurden für die Wachstumsversuche nur Segmente aus dem Bereich von 5-15 mm unterhalb des Hypokotylhakens geschnitten. Das Inkubationsmedium war 10 mM MES-NaOH, pH 6,0, mit 2 mM KCl. GA_3, IAA oder 2,4-D wurde dem Puffer zwischen 3 und 10 µM zugesetzt. Die Wachstumsmessungen wurden mit einer Wegaufnehmer-Apparatur durchgeführt. Die Wachstumstests ergaben, daß GA_3 weder einen Effekt auf das Grundwachstum (0,5 mm/h) hatte, noch das durch IAA (ca. 2,0 mm/h) oder 2,4-D (ca. 2,0 mm/h) induzierte Längenwachstum beeinflußte.

1.2. PAL-Aktivität: Lokalisierung und Abhängigkeit von Gibberellin

1.2.1 Lokalisierung der PAL-Aktivität

Untersuchungen von Barnes und Jones (1984) mit Salat-Hypokotylsegmenten haben gezeigt, daß ein durch GA_3 oder Dunkelheit gesteigertes Längenwachstum mit niedriger PAL-Aktivität korreliert ist, während bei Licht ohne GA_3 inkubierte Segmente hohe PAL-Aktivität zeigen. In den folgenden Experimenten liegt für die Untersuchung des Einflusses von GA_3 und Licht mit Zucchinihypokotylen ein Gewebe vor, das kein GA_3-inkubiertes Längenwachstum zeigt.

Die spezifische PAL-Aktivität des Überstandes der Vorzentrifugation betrug 0,311 , die der 48.000 x g-Fraktion

0,442 $nmol \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$. Es konnte eine deutliche geringere Enzymaktivität im Überstand der Vorzentrifugation im Vergleich zum Überstand der letzten Zentrifugation festgestellt werden. Die folgenden Experimente wurden aufgrund der höheren Aktivität mit dem durch die letzte Zentrifugation erhaltenen Überstand durchgeführt.

1.2.2. Einfluß von GA_3 und Licht auf die PAL-Aktivität

Zucchini-Hypokotylsegmente wurden in einem Puffer inkubiert, der im Testansatz GA_3 enthielt. Nach 1,5 h und 26 h Inkubation bei Licht und GA_3 oder Dunkelheit wurden die Segmente vom Puffer getrennt. Die anschließende Aufarbeitung des Gewebes umfaßte Homogenisierung, Filtration und Zentrifugation.

Die Kinetik der Enzymreaktion, aufgenommen durch die Entnahme von 4 Aliquots aus dem Enzym-Testmedium, ergab für alle Testansätze einen linearen Verlauf.

Inkubationsdauer [h]	Weißlicht (3500 Lux)		Dunkel
	- GA_3	+ GA_3	- GA_3
	PAL-Aktivität [$nmol \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$]		
1,5	0,927	0,966	
26,0	1,735	1,327	0,911

Tab. 2: Einfluß von GA_3 auf die spezifische PAL-Aktivität in Zucchinihypokotyl.

Tab. 2 zeigt das Resultat eines repräsentativen Experimentes aus einer Reihe von 6 Untersuchungen, die das dargestellte Ergebnis bestätigen.

Nach 1,5 h Inkubation konnte kein Einfluß von GA_3 auf die PAL-Aktivität festgestellt werden. Das Gewebe, das 26 h in GA_3 inkubiert wurde, zeigte eine Reduzierung der PAL-Aktivität um 24 % gegenüber der Kontrolle. Die Messung der Enzymaktivitäten von Proben ohne GA_3, die bei Dunkelheit inkubiert wurden, ergab gegenüber einer Lichtkontrolle eine Verringerung des Substratumsatzes auf 53 %.

Die höhere Aktivität der PAL der Testansätze bei Licht nach 26 h ist auf die Synthese der PAL zurückzuführen, die durch GA_3 beeinflußt werden kann.

Im folgenden Versuch wurde die Aktivität der PAL sowohl im Überstand als auch im resuspendierten Pellet gemessen.

Zucchini-Hypokotylsegmenten im Testansatz wurde GA_3 zugesetzt. Die Inkubationszeit betrug 18 h. Wie bereits erwähnt, erfolgte die Bestimmung der PAL-Aktivität durch die Aufnahme einer Enzymkinetik, die auf Absorptionsmessungen zu 4 Zeitpunkten basiert. Die Messung der Enzymaktivität in den Pellets wurde einmal durchgeführt.

Fraktion	- GA_3	+ GA_3
	PAL-Aktivität [$nmol \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$]	
Überstand	2,277	1,735
Pellet	0,396	0,396

Tab. 3: Einfluß von GA_3 auf die spezifische Aktivität der PAL eines zellfreien Extraktes aus Zucchinihypokotyl. Die Proben wurden 18 h inkubiert.

Tab. 3 zeigt erstens im Überstand der 48.000 x g Fraktion eine deutlich höhere PAL-Aktivität als im Pellet und zweitens, daß nur im Überstand die bereits festgestellte Reduzierung der Enzymaktivität durch GA_3 gemessen werden kann.

Das bedeutet, daß die PAL-Aktivität vor allem in löslichen Zellbestandteilen, wahrscheinlich im Cytoplasma, zu finden ist und dieser Anteil durch GA_3 beeinflußt werden kann.

Es wurde in einem Gewebe, das kein GA_3-induziertes Wachstum zeigt, die Kompetenz festgestellt, daß durch GA_3 oder Licht die PAL-Synthese beeinflußt werden kann.

2. Calcium-Aufnahme in Hypokotylsegmente von Zucchini

2.1. Kinetik der Ca^{2+}-Aufnahme

Eine Wechselwirkung von Auxin und Calcium in verschiedenen Organen und Geweben ist bekannt (dela Fuente, 1984; Hertel, 1983).

In den folgenden Experimenten wurde die Frage zu klären versucht, ob GA_3 Einfluß auf die Ca^{2+}-Aufnahme in Zucchini-Hypokotylsegmente hat.

Je Versuchsansatz wurden 5 g gleich lange Hypokotylsegmente zwischen 30 und 60 Minuten in 50 ml Puffer 1 vorinkubiert. Anschließend wurde dem Testansatz 10 µM GA_3 zugesetzt. Nach weiteren 30-40 Minuten erfolgte die Zugabe von 2×10^5 cpm $^{45}Ca^{2+}$ je Probe. In definierten Zeitabständen wurden aus dem Inkubationsmedium Aliquots entnommen, gewaschen, überschüssiges Inkubationsmedium abgesaugt und die Radioaktivität im Gewebe bestimmt.

Die Kinetik der Ca^{2+}-Aufnahme ist in Abb. 2 dargestellt. Während der Inkubation ist die Ca^{2+}-Aufnahmerate nicht konstant. Sie ist unmittelbar nach Inkubationsbeginn am

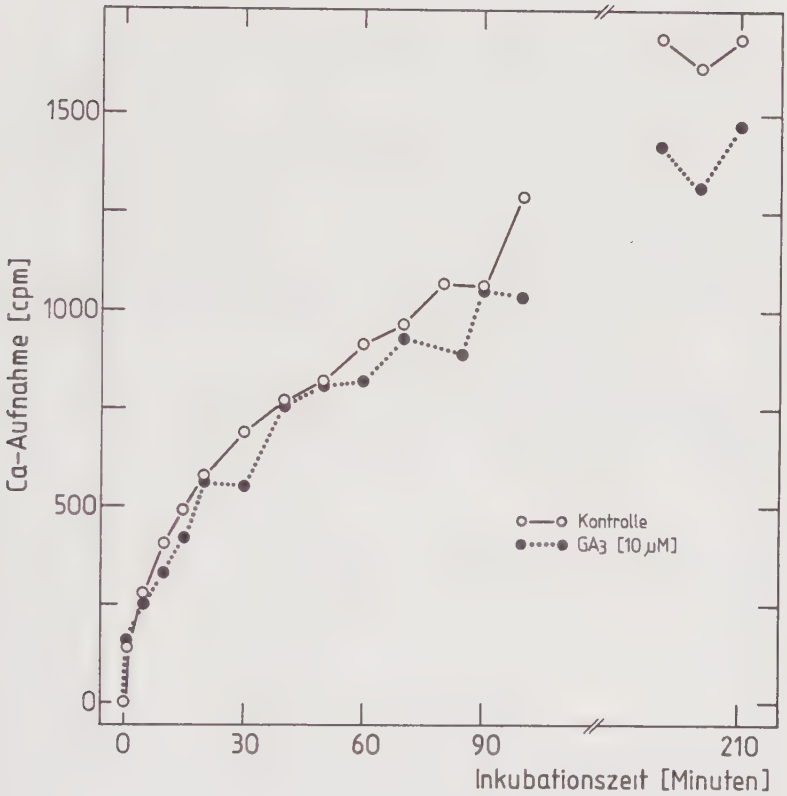


Abb. 2: Kinetik der Ca^{2+}-Aufnahme in Zucchini-Hypokotylsegmente in Abhängigkeit von GA_3. Die Segmente wurden 40 Minuten vorinkubiert.

höchsten, nimmt nach 10-15 min Inkubation deutlich ab und bleibt dann konstant. Die hohe Ca^{2+}-Aufnahmerate zu Inkubationsbeginn deutet auf eine Ca^{2+}-Aufnahme in die Zellwand hin. Die geringere Aufnahmerate resultiert aus einer Ca^{2+}-Aufnahme in die Zellen.

2.2. Aufnahme von Ca^{2+} in Abhängigkeit von der GA_3-Konzentration

Um die Regulation der Ca^{2+}-Aufnahme durch GA_3 zu prüfen, wurden Puffer 1 verschiedene GA_3 Konzentrationen von 1 µM-100 µM zugesetzt.

In Kontroll- und in den Testansätzen befanden sich jeweils 48 Segmente mit einer Masse von 1,2 g, die in 10,8 ml inkubiert wurden. Jeder Versuchsansatz enthielt

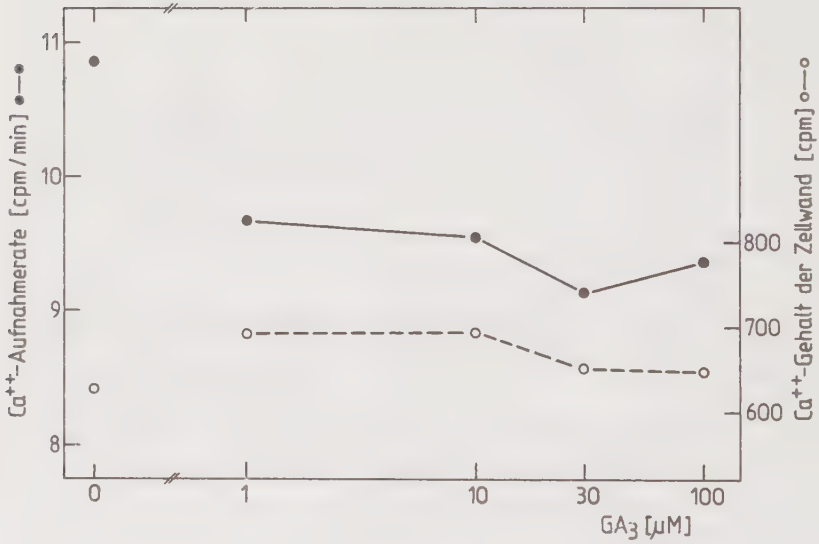


Abb. 3: Aufnahme von Ca^{2+} in Zucchinisegmente in Abhängigkeit von GA_3. Die Inkubationszeit betrug 15 und 210 Minuten.

67.000 cpm $^{45}Ca^{2+}$. Nach 15 min und nach 210 min Inkubation erfolgten aus jedem Versuchsansatz jeweils 3 unabhängige Entnahmen von je 8 Segmenten um eine statistische Absicherung des Ergebnisses zu erhalten. Die weitere Handhabung der Segmente wurde bereits dargestellt.

Die gemessene Radioaktivität der einzelnen Testansätze mit GA_3 wurde zu jedem Entnahmezeitpunkt auf die Radioaktivität der Kontrollansätze ohne GA_3 bezogen. Der Einfluß von GA_3 auf die Ca^{2+}-Aufnahme in die Zellen wurde aus der Zunahme des Ca^{2+}-Gehaltes zwischen den beiden Entnahmezeitpunkten bestimmt. Aus der Berechnung der Regressionsgeraden geht der Ca^{2+}-Gehalt hervor, der sofort, mit dem Einsetzen der Segmente in den Puffer, in das Gewebe aufgenommen wird. Dieser Ca^{2+}-Gehalt kann als Calcium-Aufnahme in die Zellwand interpretiert werden.

Das Ergebnis (Abb. 3) zeigt, daß die Ca^{2+}-Aufnahme in die Zelle durch GA_3 reduziert wird, während die Aufnahme in die Zellwand nicht beeinflußt ist.

2.3. Einfluß von GA_3 auf die Ca^{2+}-Abgabe

Die in den vorherigen Experimenten untersuchte passive Calcium-Aufnahme überlagert den aktiven Ca^{2+}-Transport aus der Zelle, der neben einem Ca^{2+}-Transport in bestimmte Zellorganellen mit dazu beiträgt, die niedrige freie cytoplasmatische Calciumkonzentration aufrechtzuerhalten.

In dem folgenden Versuch wurde versucht, den Einfluß von GA_3 auf den aktiven Calcium-Transport aus der Zelle zu messen, nachdem durch EGTA eine drastische Reduzierung der freien Calcium-Konzentration im Inkubationsmedium erreicht wurde.

Ungefähr 200 Segmente mit einer Masse von zusammen 5 g wurden in 45 ml Puffer 1 mit 10 µM $CaCl_2$ und $1,5 \times 10^5$ cpm $^{45}Ca^{2+}$ für 120 Minuten vorinkubiert. Während der Vorinkubation wurden in definierten Zeitintervallen Proben entnommen

und die Ca^{2+}-Aufnahme gemessen. Zwei Stunden nach Inkubationsbeginn wurde dem Puffer 1 mM EGTA zugesetzt. EGTA bindet freies Ca^{2+} mit hoher Affinität. Die Dissoziationskonstante (K_D) für Ca^{2+}·EGTA beträgt 3×10^{-7} M, K_D für Mg^{2+}·EGTA beträgt 3×10^{-2} M. Die Segmente und das Inkubationsmedium wurden nach der Zugabe des Komplexbildners in einen Testansatz mit 10 µM GA_3 und einen Kontrollansatz ohne GA_3 aufgeteilt.

In bestimmten Zeitabständen nach Einsatz von GA_3 und EGTA wurden Segmente über einen Zeitraum von weiteren 120 Minuten aus den Versuchsansätzen entnommen.

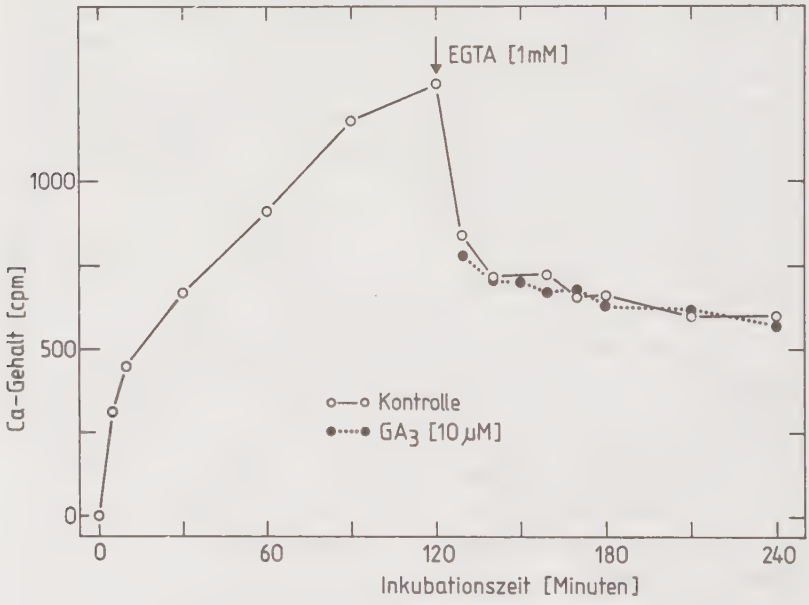


Abb. 4: Abhängigkeit der Ca^{2+}-Abgabe aus Zucchini-Hypokotylsegmenten von GA_3. Das Gewebe wurde 2 h in Ca^{2+} inkubiert. Nach 2 h Inkubation erfolgte die Zugabe des Calcium-Komplexbildners EGTA (1 mM) und die Teilung des Versuchsansatzes in Proben mit und ohne GA_3.

Die in Abb. 4 dargestellten Daten sind das Ergebnis eines repräsentativen Experimentes aus einer Reihe mit 5 Versuchen. Zu jedem Zeitpunkt wurden 8 Segmente entnommen und die Radioaktivität bestimmt.

EGTA führte innerhalb der ersten 10 Minuten zu einer drastischen Ca^{2+}-Abgabe aus den Segmenten. Die Größenordnung dieser Ca^{2+}-Freisetzung entspricht der Calciumaufnahme in den 10 Minuten der Inkubation. Dies spricht dafür, daß zunächst in den Zellwandraum aufgenommenes Calcium durch EGTA quantitativ entfernt wurde. Danach nimmt die Rate der Ca^{2+}-Freisetzung deutlich ab. An der Ca^{2+}-Abgabe könnte neben dem bereits erwähnten aktiven Calciumtransport aus der Zelle auch ein passiver Calciumstrom, der dem Konzentrationsgefälle folgt, beteiligt sein. Eine Abhängigkeit der Ca^{2+}-Abgaberate von GA_3 war nicht zu beobachten.

2.4. Abhängigkeit der Ca^{2+}-Aufnahme von der Ca^{2+}-Konzentration

Zur Charakterisierung des Ca^{2+}-Transportes wurde die Abhängigkeit der Ca^{2+}-Aufnahme von der äußeren Ca^{2+}-Konzentration bestimmt.

Jeder Versuchsansatz enthielt 16 Segmente mit einem Gesamtgewicht von 400 mg in 3,6 ml Puffer 1 mit Ca^{2+}-Konzentrationen zwischen 10 µM und 3,0 mM. Die in jedem Ansatz eingesetzte Radioaktivität betrug 9700 cpm/ml Puffer. Zur Messung des Ca^{2+}-Gehaltes wurden 15 Minuten und 210 Minuten nach Inkubationsbeginn aus jedem Ansatz 8 Segmente entnommen, gewaschen und die Radioaktivität bestimmt.

Die Regressionsgerade gibt die Information über die Ca^{2+}-Aufnahmerate in die Zelle und den unmittelbar zu Inkubationsbeginn aufgenommenen Ca^{2+}-Gehalt in die Zellwand.

Das im Inkubationsmedium enthaltene Magnesium und Kalium diente zur Absättigung unspezifischer Ca^{2+}-Bindungsstellen.

Die Calciumaufnahme in die Zellwand zeigt ein Sättigungsverhalten bezüglich der angebotenen Calciumkonzen-

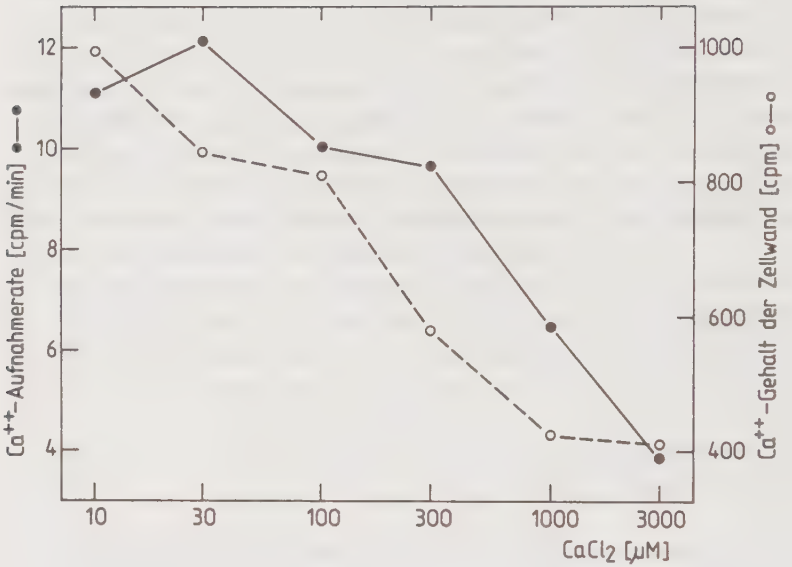


Abb. 5: Abhängigkeit der Ca^{2+}-Aufnahmerate in die Zelle und der Ca^{2+}-Aufnahme in die Zellwand von der Ca^{2+}-Konzentration. Die Zucchini-Hypokotylsegmente wurden 15 und 210 Minuten inkubiert.

tration (Abb. 5). Bei Ca^{2+}-Konzentrationen von über 1mM $CaCl_2$ waren alle sättigbaren Bindungsstellen besetzt. Der Anteil der nichtsättigbaren Wandbindung beträgt 20 %. Der abgeschätzte K_D-Wert der Calciumwandbindungsstellen liegt bei ungefähr 160 µM.

Bei der Calciumaufnahme in die Zelle ist ebenfalls ein Sättigungsverhalten festzustellen. Der effektive K_M-Wert ist größer als 1 mM.

2.5. Lokalisierung des GA_3-Einflusses auf die Ca^{2+}-Aufnahme

Die Versuche mit Zucchini-Hypokotylsegmenten zeigten eine deutliche Reduzierung der Ca^{2+}-Aufnahme durch GA_3. In den folgenden Experimenten sollte geklärt werden, in welchem Kompartiment der Zellen die Ca^{2+}-Konzentration durch GA_3 beeinflußt werden kann.

Dazu wurden Zucchinisegmente mit KCl, $MgCl_2$, $^{45}Ca^{2+}$ und GA_3 inkubiert und nach 3,5 h aus dem Inkubationsmedium herausgenommen und homogenisiert. Die Bestimmung des Ca^{2+}-Gehaltes der untersuchten Fraktionen erfolgte durch Messung der Radioaktivität. Die Zellbestandteile wurden wie unter Kap. 4.2. beschrieben fraktioniert.

Die Ergebnisse der Versuchsreihe, in der der Ca^{2+}-Gehalt von Überstand und und Pellet der Vorzentrifugation und der mikrosomalen Fraktion gemessen wurde, ist in Tab. 4a dargestellt.

Fraktion	Ca^{2+}-Gehalt [% der Kontrolle]	
Rohomogenat	96	±1,1
1.000 x g, 5 min		
Überstand	97	±1,9
Pellet	86	±6,2
48.000 x g, 10 min		
Überstand	103	±7,9
Pellet	90	±5,7

Tab. 4 a: Einfluß von GA_3 auf die Ca^{2+}-Aufnahme in Zucchini-Hypokotylsegmente. Das Gewebe wurde 3,25 h mit 10 µM GA_3 inkubiert, aufgeschlossen und zentrifugiert. Die Daten sind Mittelwerte (±SEM) von je mindestens 5 Experimenten.

In einem weiteren Experiment wurde versucht, sowohl den Effekt von GA_3 auf die Ca^{2+}-Aufnahme in "Mitochondrien" und "Plastiden" festzustellen als auch den Anteil von gebundenem und freiem Calcium in dem jeweiligen Kompartiment zu unterscheiden.

Dazu wurde den resuspendierten Pellets der Calcium-Ionophor X-537A zugesetzt. Der Einsatz des Ionophors ermöglicht Calcium den Durchtritt durch Membranen. Nach Zugabe des Ionophors wurden die Proben erneut zentrifugiert.

Die Messungen des relativen Ca^{2+}-Gehaltes der Rohhomogenate und der Fraktionen der Vorzentrifugation beider Versuchsreihen wurden zusammengefaßt. Die Daten zeigen bezüglich der Rohhomogenate und der Vorzentrifugation Mittelwerte von 9 Experimenten. Der Ca^{2+}-Gehalt der mikrosomalen Fraktion wurde 5 mal, der aller anderen Fraktionen 4 mal gemessen.

Im Pellet der Vorzentrifugation ließ sich ein größerer Einfluß von GA_3 auf die relative Ca^{2+}-Aufnahme feststellen als im Rohhomogenat. Der Ca^{2+}-Gehalt des Überstandes zeigte keine Abhängigkeit von GA_3. Das 50.000 x g Pellet der Testansätze mit GA_3 enthielt einen geringeren Ca^{2+}-Gehalt als die Kontrolle ohne GA_3.

In der "mitochondrialen Fraktion" konnte in den Proben mit GA_3 gegenüber Proben ohne GA_3 ein geringerer Ca^{2+}-Gehalt gemessen werden. Die gleiche Reduzierung des Ca^{2+}-Gehaltes durch GA_3 wie im Pellet der mitochondrialen Fraktion ließ sich in den Überständen der letzten Zentrifugation feststellen.

Die Ca^{2+}-Freisetzung aus "Chloroplasten" und "Mitochondrien" ist in Tab. 4b dargestellt. Durch den Einsatz des Calcium-Ionophors X-537A konnte aus den resuspendierten "Chloroplasten"-Pellets 80 % des in der Probe insgesamt enthaltenen Calcium freigesetzt werden. Dies waren ungefähr 55 % mehr als ohne Lasalocid freigesetzt wurde.

In "Mitochondrien" ließ sich durch X-537A ungefähr 60 % des in der Probe enthaltenen Calciums freisetzen, das war

Fraktion	Freisetzbares Ca^{2+} [% des Ca^{2+}-Gehaltes der Probe]	
	- X-537A	+ X-537A
3.000 x g, 10 min	51 ±3,1	80 ±1,4
12.000 x g, 10 min	54 ±1,2	61 ±1,4

Tab. 4 b: Unterscheidung von freiem und gebundenem Ca^{2+} in verschiedenen Zellkompartimenten von Zucchinihypokotyl. Das Gewebe wurde 3,25 h inkubiert, aufgeschlossen und zentrifugiert. Die resuspendierten Pellets erhielten gegebenenfalls 10 µM des Calciumionophors X-537A und wurden erneut zentrifugiert. Die Daten sind Mittelwerte (±SEM) und geben den freisetzbaren Anteil des Gesamtcalciumgehaltes des resuspendierten Pellets an.

ungefähr 13 % mehr als resuspendierte Pellets ohne Lasalocid abgaben. Eine deutliche Abhängigkeit der Calciumabgabe von GA_3 wurde nicht beobachtet. Der Zusatz von Rutheniumrot, einem Inhibitor der mitochondrialen Ca^{2+}-Aufnahme (Dieter und Marmé, 1980 b) zu dem Homogenisierungsmedium und bei der Resuspension der "mitochondrialen Fraktion", zeigte keinen Einfluß auf den Ca^{2+}-Gehalt der einzelnen Fraktionen.

Die Daten zeigen, daß sich auch nach Aufschluß des Gewebes durch Homogenisieren mit einem Mörser- im Rohhomogenat eine GA_3 abhängige Reduzierung des Ca^{2+}-Gehaltes nachweisen läßt, die ungefähr gleich der bei intakten Segmenten ist.

Im Pellet der Vorzentifugation, das im wesentlichen aus intakten Zellen, Zelltrümmern, Chloroplasten, Mitochondrien und Zellwand besteht, konnte ebenfalls noch der Einfluß von GA_3 auf die Ca^{2+}-Aufnahme gemessen werden. Die Auswertung weiterer Fraktionen ergab keine eindeutige Information dar-

über, in welchem Kompartiment der Zelle die Ca^{2+}-Konzentration durch GA_3 beeinflußt wird.

Die Freisetzung von Ca^{2+} ohne Lasalocid durch Diffusion und Dissoziation von Bindungsstellen betrug sowohl bei den "Chloroplasten" als auch bei den "Mitochondrien" jeweils 55 % des in der Probe vorhanden Calciums.

Der nicht durch Lasalocid freisetzbare Calciumanteil ist das gebundene Calcium. 20 % des Gesamtcalciums wird in den Chloroplasten und 39 % in den Mitochondrien nicht freigesetzt.

3. Einfluß von Calcium auf die PAL-Aktivität

Um die Frage zu klären, ob eine Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration die PAL-Aktivität beeinflußt, wurden die folgenden Versuche durchgeführt. Der Komplexbildner EGTA wurde in einem calciumfreien Inkubationsmedium eingesetzt, um Calcium im Apoplasten zu entfernen und in Gegenwart des Calciumionophors A 23187 einen Calciumaustritt aus der Zelle zu erleichtern.

	Kontrolle		EGTA (1 mM)	
A 23187 (10 nM)	-	+	-	+
Spezifische PAL-Aktivität [$nmol \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$]	2,60	2,64	1,61	1,73

Tab. 5: Einfluß des Calciumionophors A 23187 und des Calcium-Komplexbildners EGTA auf die spezifische PAL-Aktivität in Zucchinihypokotyl. Das Gewebe wurde 15 h in einem calciumfreien Puffer inkubiert. Die PAL-Aktivität wurde im Überstand der 50.000 x g Fraktion bestimmt.

Zucchini-Hypokotylsegmente wurden 14 h in calciumfreien Puffer inkubiert. Proben, die EGTA erhielten, zeigten im Enzymtest gegenüber einer Kontrolle ohne EGTA eine Reduzierung der PAL-Aktivität. Der durch EGTA ausgelöste Rückgang der Enzymaktivität um 35 % war unabhängig vom Zusatz von A 23187 (Tab. 5).

Der durch Zugabe von EGTA in das Inkubationsmedium erreichte passive Ca^{2+}-Ausstrom und die damit möglicherweise vorübergehende Erniedrigung des intrazellulären Ca^{2+}-Spiegels könnte zu einer Reduzierung der PAL-de-novo-Synthese geführt haben.

Bei Proben, die 18 h mit $CaCl_2$ und dem Calciumionophor inkubiert wurden, konnte beobachtet werden, daß die PAL-Aktivität signifikant verringert war. Die PAL-Aktivität wurde mit $CaCl_2$ auch in Proben ohne Ionophor deutlich reduziert.

Um zu prüfen, ob eventuell die PAL-de-novo-Synthese in Licht gesättigt war, und deshalb durch ein äußeres Calciumangebot nicht gesteigert werden konnte, wurden Segmente mit GA_3 oder in Dunkelheit inkubiert. Die PAL-Synthese wurde dadurch reduziert. Ein Einfluß von Ca^{2+} auf die PAL-Aktivität konnte nicht nachgewiesen werden.

4. Haferinternodien: Streckungswachstum und Calciumaufnahme

4.1. Einfluß von Phytohormonen auf das Streckungswachstum

Nachdem bei Versuchen mit Zucchini-Hypokotylsegmenten nur ein geringer Einfluß von GA_3 auf die Ca^{2+}-Aufnahme festgestellt werden konnte, wurde mit Hafersegmenten ein Untersuchungsobjekt gewählt, das im Wachstumstest eine deutliche, GA_3-spezifische Reaktion zeigt. Untersuchungen von Rapoport et al. (1978) an Hafer Sproßsegmenten ergaben, daß der GA_3-induzierte Längenzuwachs durch IAA reduziert werden konnte.

Die Dicke der Kutikula von Hafer Internodien ist 1/10 der

von Koleoptilen (Hebard et al., 1976). Die Ionenaufnahme und Abgabe ist daher wesentlich weniger durch die Kutikula behindert und kann über die ganze Oberfläche erfolgen.

Die folgenden Ergebnisse einer Wachstumsuntersuchung mit isolierten Internodien dienten als Grundlage für Versuche,

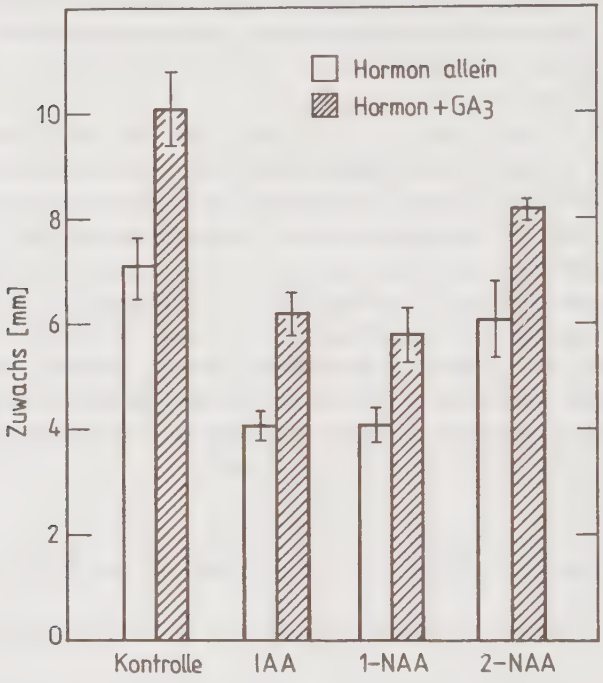


Abb. 6: Einfluß von Phytohormonen auf das Längenwachstum von Hafer-Internodiensegmenten. Die isolierten Segmente wurden 14 h in einem calciumfreien Puffer inkubiert. Die Konzentration von IAA, 1-NAA und 2-NAA betrug jeweils 10 µM, die von GA_3 30 µM.

die den Einfluß von GA_3 auf die Ca^{2+}-Aufnahme in dieses Material prüften. Unter isolierten Internodien versteht man solche Segmente, von denen Blattschaft und der Knoten entfernt wurde.

In den Testansätzen wurde die Wirkung von 30 µM GA_3, 10 µM IAA sowie der Auxinanaloga 1-NAA (10 µM) und 2-NAA (10 µM) auf das Längenwachstum von isolierten Internodien untersucht. Außerdem wurde der Effekt von IAA, 1-NAA und 2-NAA auf das GA_3-induzierte Längenwachstum gemessen.

Jeweils 7 Segmente, die eine Ausgangslänge von 10 mm hatten, wurden 14,5 h in 7 ml calciumfreiem Puffer 1 inkubiert. Die Hormone waren in Ethanol gelöst. Die maximale Ethanolkonzentration in den Ansätzen betrug 0,2 %. Abb. 6 zeigt die Mittelwerte (±SEM) der Segmente. Auch die Extrema wurden zur Mittelwertbildung herangezogen.

In Proben mit GA_3 beobachtete man einen um 40 % größeren Längenzuwachs als in der Kontrolle. IAA und 1-NAA reduzierten den Zuwachs gegenüber der Referenz jeweils um über 40 %, 2-NAA um 14 %. In der gleichen Größenordnung wie IAA, 1-NAA und 2-NAA das Grundwachstum verminderten, reduzierten sie auch das GA_3-induzierte Streckungswachstum.

4.2. Ca^{2+}-Aufnahme in Abhängigkeit von GA_3

Es wurden Experimente durchgeführt, um an einem Gewebe, das GA_3-spezifisch reagiert, den Einfluß von GA_3 auf die Ca^{2+}-Aufnahme zu untersuchen.

Zur Verminderung des Untergrundes der Ca^{2+}-Aufnahme wurde Gewebe, das nicht an dem GA_3-vermittelnden Längenwachstum beteiligt ist, so weit wie möglich entfernt. GA_3 wirkt auf Zellen des interkalaren Meristems und auf die von ihm gebildeten embryonalen Zellen (Montague et al., 1973). Das Wachstum ist jedoch, wie die Beteiligung des Meristems vermuten lassen könnte, kein Zellteilungswachstum. GA_3 blockiert die Zellteilungsaktivtät und verursacht eine

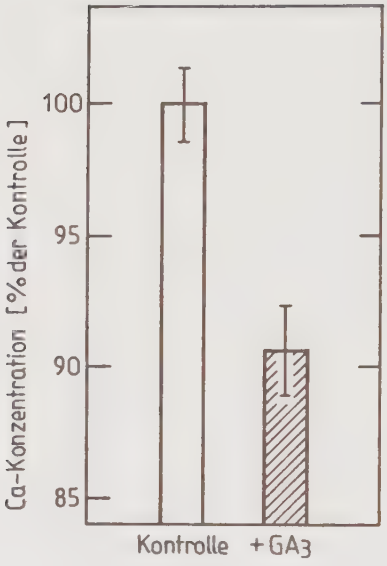


Abb. 7: Aufnahme von Ca^{2+} in Hafer-Internodiensegmente in Abhängigkeit von GA_3 bezogen auf ihre Gesamtlänge. Die Segmente wurden 14 h mit 30 µM GA_3 inkubiert.

beträchtliche Steigerung des Längenwachstums (Rapoport et al., 1978).

Die Segmente wurden in einem Puffer mit KCl, $MgCl_2$, $CaCl_2$, $^{45}Ca^{2+}$, 2 % Saccharose und gegebenenfalls GA_3 inkubiert. Die Messung der Ca^{2+}-Aufnahme erfolgte wie in Kap. 4.1. dargestellt.

Weder bei Langzeitinkubationen (mit Endpunktbestimmung) noch bei der Untersuchung der Ca^{2+}-Aufnahmekinetik unmittelbar nach Inkubationsbeginn konnte ein Einfluß von GA_3 auf die Ca^{2+}-Aufnahme festgestellt werden. Mit dem GA_3-induzier-

ten Längenwachstum ist eine Volumenvergrößerung verbunden. Die Daten der Langzeitinkubation zeigten, daß der absolute Ca^{2+}-Gehalt GA_3-inkubierter Segmente größer ist als der in der Kontrolle. Die durchschnittliche Ca^{2+}-Konzentration der Segmente, bezogen auf ihre Gesamtlänge, war dennoch in den Testansätzen mit GA_3 signifikant geringer als in den Kontrollen (Abb. 7). Bei der Berechnung der Ca^{2+}-Konzentration wurde davon ausgegangen, daß sich der Durchmesser der Segmente durch das GA_3-induzierte Wachstum nicht wesentlich ändert.

Das Ergebnis läßt die Schlußfolgerung zu, daß GA_3 an der Regulation der Ca^{2+}-Aufnahme beteiligt sein könnte, auch wenn sie hier eventuell wegen der sich drastisch ändernden Volumenverhältnisse der Proben in Gegenwart von GA_3 nicht direkt gezeigt werden konnte.

4.3. Der Einfluß der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration auf das Längenwachstum

Es wurde der Versuch unternommen, durch von außen angebotenes Calcium Einfluß auf das GA_3 induzierte Längenwachstum zu nehmen. Der Einsatz der Einsatz des Calciumionophors X-537A ermöglicht Calcium den Zugang zum Symplasten und damit eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration.

Isolierte Internodien bieten für die Aufnahme des im Inkubationsmedium gelösten Ionophors eine große Oberfläche. Durch die Beseitigung von Blattschaft und Knoten wurde auch der mögliche Einfluß von Geweben reduziert, die für das GA_3-induzierte Wachstum nicht notwendig sind.

Bevor durch den Einsatz von X-537A der Einfluß von verändertem intrazellulärem Ca^{2+}-Gehalt auf das GA_3-induzierte Wachstum geklärt werden konnte, wurde in einer Voruntersuchung die Wirkung des Ionophors auf das Streckungswachstum geprüft. Außerdem wurde die Spezifität des Ionophors für die divalenten Kationen Ca^{2+} und Mg^{2+} untersucht.

Jeweils 8 isolierte Segmente befanden sich in einem calciumfreien Puffer 1, der 30 µM GA_3, verschiedene Konzentrationen X-537A und gegebenenfalls 3 mM $MgCl_2$ enthielt. Nach einer Inkubationszeit von 18 h wurde der Längenzuwachs bestimmt. Die Resultate in Abb. 8 sind Mittelwerte (±SEM) aus 7 Versuchen mit je 7 Segmenten.

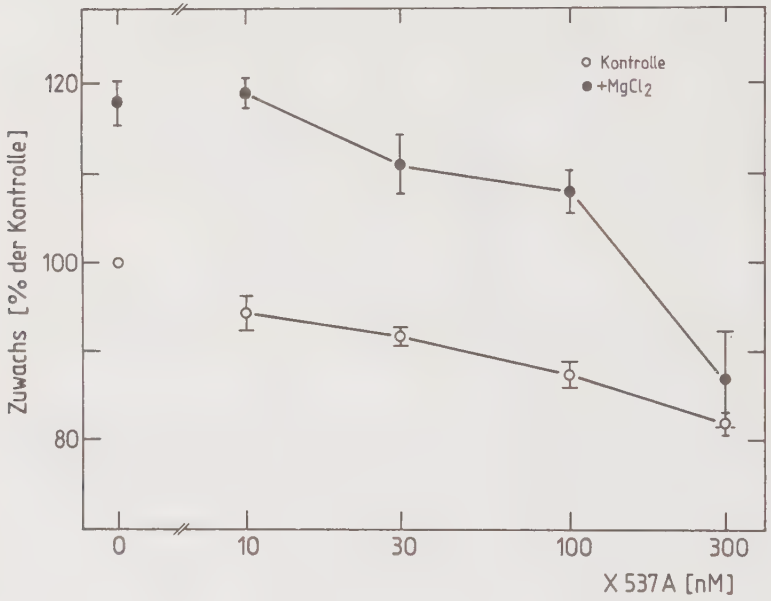


Abb. 8: Einfluß des Calcium-Ionophors X-537A auf das GA_3-induzierte Wachstum von Hafer-Internodiensegmenten. Isolierte Sproßsegmente wurden 18 h in einem calciumfreien Puffer ohne $MgCl_2$ und mit 3 mM $MgCl_2$ in Gegenwart von 30 µM GA_3 inkubiert. Die Daten sind Mittelwerte (±SEM) aus 7 Versuchen mit je 7 Segmenten.

Das Ergebnis zeigt, daß in den Proben, die keinen oder nur eine geringe Konzentration des Ionophors X-537A enthielten, $MgCl_2$ zu einer deutlichen Steigerung des Längenwachstums führte. Geringe Konzentrationen des Ionophors zwischen 10 nM und 100 nM hatten sowohl in den Ansätzen mit $MgCl_2$ als auch in den Kontrollen ohne $MgCl_2$ wenig Einfluß auf das Längenwachstum. Die Reduzierung des Wachstums war bei niedrigen Lasalocid-Konzentrationen nicht durch $MgCl_2$ beeinflußbar. Konzentrationen von über 100 nM X-537A bewirkten dagegen bei Proben mit $MgCl_2$ eine deutliche Abnahme des Zuwachses.

Die Reduzierung des Wachstums könnte ihre Ursache in unspezifischen Effekten, besonders in einer Entkopplerwirkung des Ionophors haben.

Das Resultat einer Versuchsreihe, die die Abhängigkeit des Längenwachstums von der exogenen Ca^{2+}-Konzentration untersuchte, ist in Abb. 9 dargestellt. Die isolierten Internodien wurden 18 h mit 30 µM GA_3 in Puffer 1 mit verschiedenen Calciumkonzentrationen inkubiert. Die Daten sind Mittelwerte (±SEM) von 8 Experimten mit je 8 Segmenten je Probe.

Das angebotene Calcium bewirkt nur eine geringe Reduzierung des Wachstums. In Gegenwart von 30 nM Lasalocid führte eine Erhöhung des Calciumangebotes zu einer Reduzierung des Zuwachses um bis zu 25 % im Vergleich zu einer calciumfreien Probe, die nur den Ionophor erhielt. Der Ionophor allein reduzierte das Wachstum um 7 %.

Das Ergebnis zeigt, daß die Reduzierung des Wachstums durch den Ionophor und Calcium größer ist als die Summe der Einzeleffekte durch X-537A und Calcium.

Die Abhängigkeit des GA_3-induzierten Längenwachstums von der $MgCl_2$-Konzentration ist ebenfalls in Abb. 9 dargestellt. Das Inkubationsmedium bestand aus Puffer 1, dem verschiedene Konzentrationen $MgCl_2$ zugesetzt wurden. Alle Ansätze enthielten 30 µM GA_3, die Testansätze zusätzlich 30 nM Lasalocid. Die Inkubationszeit betrug 20 h. Die Daten sind Mittelwerte aus 5 Versuchen mit 8 Einzelproben je Ansatz. Die

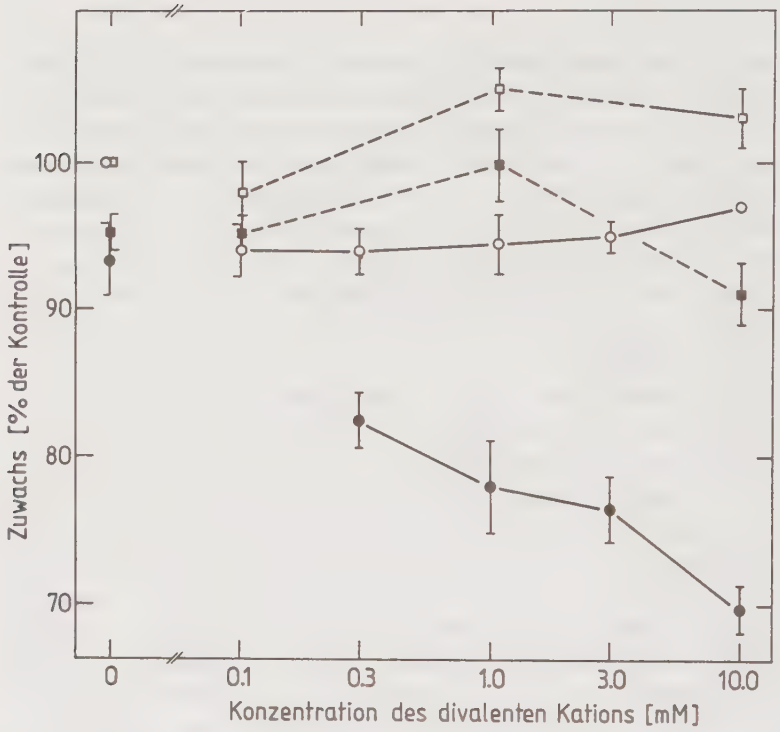


Abb. 9: Abhängigkeit des GA_3-induzierten Wachstum von Hafersegmenten von Ca^{2+} und Mg^{2+}. Isolierte Internodien wurden 18 h ohne (○ , □) und mit 30 nM Ionophor (● , ■) inkubiert. Die Proben erhielten $CaCl_2$ (○ , ●) bzw. $MgCl_2$ (□ , ■). Alle Proben wurde 30 µM GA_3 zugesetzt. Die Daten sind Mittelwerte (±SEM) aus mindestens 5 Versuchsreihen mit je 8 Einzelproben.

Extrema wurden zur Auswertung nicht herangezogen.

Das Ergebnis zeigt, daß in Proben ohne Lasalocid ein zunehmendes $MgCl_2$-Angebot zu einer kleinen, aber signifikanten Steigerung des Wachstums führte, während bei steigenden $CaCl_2$-Konzentrationen eine geringe Reduzierung des Zuwachses zu beobachten war. In Gegenwart von Lasalocid führte eine

Steigerung des $MgCl_2$-Angebotes auf 10 mM nicht zu einer Verringerung des Wachstums in der Größenordnung, wie sie durch ein steigendes $CaCl_2$-Angebot bewirkt wurde. Im Gegenteil, $MgCl_2$-Konzentrationen von 0,1-1,0 mM machten die durch den Einsatz von Lasalocid bedingte Verringerung des Wachstums wieder rückgängig.

Einerseits könnte Calcium könnte durch eine verstärkte Verknüpfung von Pektinmolekülen die Extensibilität der Zellwand vermindern, ein verringertes Wachstum wäre die Folge.

Andererseits könnte Calcium bei Einsatz des Ionophors die cytoplasmatische Calciumkonzentration erhöhen. Die erhöhte Calciumkonzentration könnte biochemische Reaktionen auslösen, die das GA_3-induzierte Wachstum reduzieren.

Magnesium führt im Gegensatz zu Calcium zu einem verstärkten Wachstum. Der bei niedrigen Magnesiumkonzentrationen zu beobachtende Längenzuwachs ist unabhängig von X-537 A. Dies könnte darauf hindeuten, daß durch X-537A keine Permeabilisierung für Magnesium ausgelöst wird, weil es nur eine geringe Affinität für Mg^{2+}-Ionen hat oder darauf, daß die freie cytoplasmatische Mg^{2+}-Konzentration in der Größenordnung der extrazellulären Magnesiumkonzentration liegt (vgl. Hepler und Wayne, 1985). Die Daten zeigen, daß Magnesium die Funktion von Calcium bei der Reduzierung des GA_3-induzierten Wachstums nicht übernehmen kann.

5. Einfluß von Gibberellin und Auxin auf die geotropische Reaktion und das Längenwachstum

5.1. Geotropismus und Streckungswachstum bei Haferinternodien

Um die Rolle der Phytohormone Auxin und Gibberellinsäure bei der geotropischen Reaktion von Hafer-Internodiensegmenten zu untersuchen, wurden die folgenden Experimente durchgeführt. Eine teilweise Charakterisierung des Unter-

suchungsmaterials hinsichtlich des Einflusses von Phytohormonen auf die geotropische Reaktion liegt bereits vor.

Pharis et al. (1981) stellten eine Asymmetrie der endogenen GA_3-Konzentration in den p-1 Knoten geotropisch stimulierter Hafersegmente fest. In den Knoten, verantwortlich für die Perzeption des Schwerkraftreizes und die Umsetzung des Signals durch differentielles Wachstum, zeigten die unteren gegenüber den oberen Segmenthälften eine Zunahme der GA_3-Konzentration. Ein allseitiges, symmetrisches Angebot von IAA oder 2,4-D reduzierte die geotropische Krümmung von horizontal orientierten Segmenten. Dayanandan et al. (1976) beobachteten an Knoten von vertikalen Hafersegmenten keinen Einfluß von GA_3 auf das Knotenwachstum, während IAA gegenüber einer Kontrolle ohne IAA zu einem größeren Längenwachstum des Knotens führte.

Die Hafersegmente bieten durch ihre Größe und relative Druckunempfindlichkeit eine gute Handhabbarkeit vor allem in solchen Testsystemen, die auf eine Fixierung von Segmenten zur Untersuchung von Tropismen angewiesen sind.

In den Versuchen sollte die Wechselwirkung der Phytohormone Gibberellinsäure, Auxin und des Auxinanalogons 2,4-D bei der geotropischen Reaktion und beim Längenwachstum von Haferinternodien untersucht werden. Dazu wurde zunächst der Einfluß der verschiedenen Hormone allein ermittelt.

Die Hafersegmente wurden an ihrem basalen Ende in horizontaler Position fixiert. Das apikale Ende war frei beweglich. In den Versuchsansätzen wurden die Hormone, wenn nicht anders vermerkt, in einer Konzentration von 10 µM im Inkubationsmedium angeboten. Nach einer Inkubationszeit von durchschnittlich 23 h wurde der Längenzuwachs und der Winkel zwischen dem frei beweglichen apikalen Segmentteil und der Horizontalen bestimmt.

Das Resultat der gezeigten repräsentativen Experimente stimmt mit dem Mittelwert aller Versuche der Versuchsreihe überein. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse war sowohl bei der Auswertung der geotropischen Reaktion als auch bei

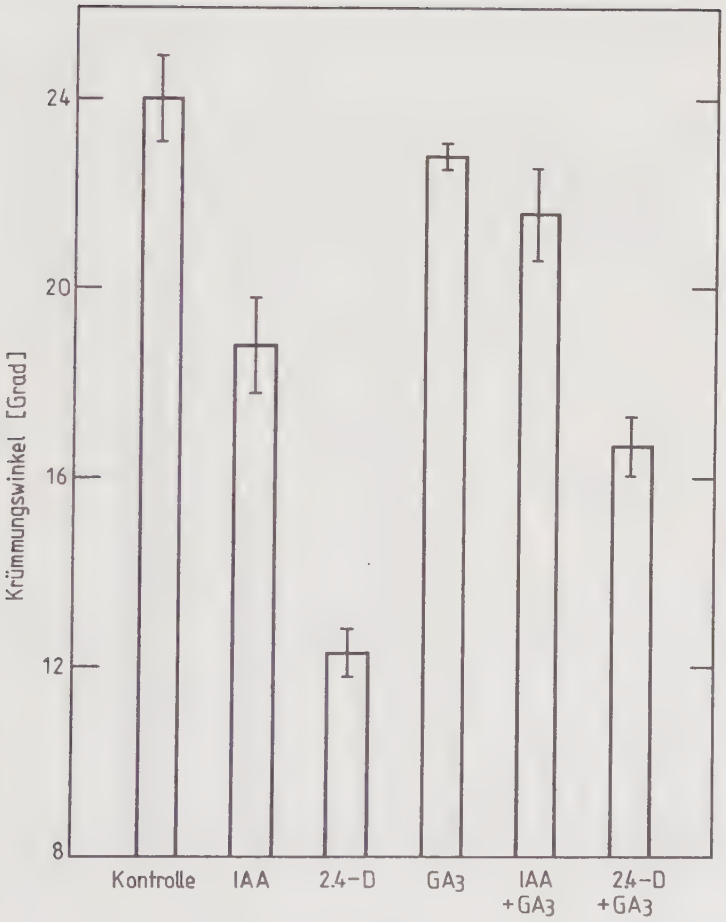


Abb. 10 a: Wechselwirkung von Gibberellin, Auxin und 2,4-D bei der geotropischen Reaktion von Haferinternodien. Die Segmente wurden 23 h inkubiert. Die Hormone wurden je 10 µM eingesetzt. Die Daten sind Mittelwerte (±SEM) aus 5 Einzelproben.

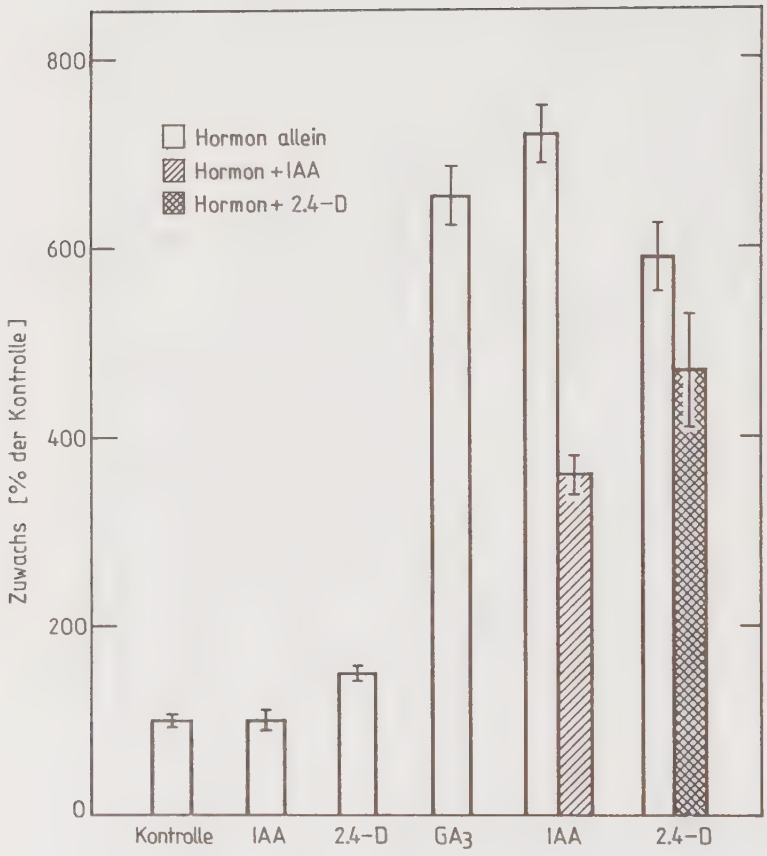


Abb. 10 b: Wechselwirkungen von Gibberellin, Auxin und 2,4-D bei dem Längenwachstum von Haferinternodien. Die Versuchsdurchführung und Inkubationsbedingungen waren identisch mit denen in Abb. 10 a.

bei der Messung des Längenzuwachses im allgemeinen gut.

Die in Abb.10 a. und b. dargestellten Daten sind Mittelwerte (±SEM) eines Experimentes mit mindestens 5 Einzelproben.

Sowohl der Kontroll- als auch die Testansätze mit IAA, 2,4-D und GA_3 zeigten eine deutliche negativ geotropische Reaktion. GA_3 hatte keinen Einfluß auf die geotropische Krümmung der Segmente, vervielfachte aber den Längenzuwachs. Es ist erkennbar, daß durch IAA, stärker noch durch 2,4-D, die geotropische Reaktion um 2o % bzw. 45 % reduziert werden kann. Das Streckungswachstum wird durch IAA nicht beeinflußt, während es durch 2,4-D erhöht wird.

Die Wechselwirkung von GA_3 und IAA oder 2,4-D ist ebenfalls in Abb.10 a. und b. dargestellt. GA_3 kann die durch IAA oder 2,4-D herbeigeführte Reduzierung der negativ geotropischen Krümmung aufheben. Die Rekonstitution durch GA_3 beträgt ungefähr 15 % bei Inkubation der Segmente in IAA und 35 % bei Proben, die 2,4-D enthalten.

Weil in Abhängigkeit vom Entwicklungszustand der Internodien der wachstumsfördernde Einfluß von GA_3 auf den Längenzuwachs erheblich schwanken kann, wurden zur Darstellung der Wechselwirkung von GA_3, IAA und 2,4-D die Werte des GA_3-induzierten Wachstums des jeweiligen Versuchsansatzes mit in die Abbildung aufgenommen (Abb.10 b). Die Knoten zeigen dagegen über einen längeren Zeitraum gleichbleibende morphologische und physiologische Eigenschaften (vgl. Bridges und Wilkins, 1973). IAA halbiert das durch GA_3 gesteigerte Wachstum. Die Reduzierung des GA_3-induzierten Wachstums durch 2,4-D ist deutlich geringer.

Die Konzentrationsabhängigkeit der durch 2,4-D verminderten negativ geotropischen Krümmung und des durch 2,4-D gesteigerten Wachstums zeigt Abb.11. Der Kurvenverlauf bestätigt die bereits erwähnte stärkere Reduzierung der geotropischen Reaktion durch 2,4-D im Vergleich zu IAA. Ungefähr 1 µM 2,4-D oder 10 µM IAA (siehe oben) führen zu einer Reduzierung der geotropischen Krümmung auf 80 % des Kontroll-

wertes. Ein 2,4-D Angebot von 100 nM zeigte keinen Einfluß auf die geotropische Reaktion und das Streckungswachstum. 10 µM 2,4-D reduzierten die geotropische Krümmung um 50 % und steigerten das Grundwachstum um 50 %.

Das GA_3-induzierte Längenwachstum bei Haferinternodien sowie seine Reduzierung durch IAA ist in der Literatur beschrieben. IAA wird dabei als nichtkompetitiver Inhibitor

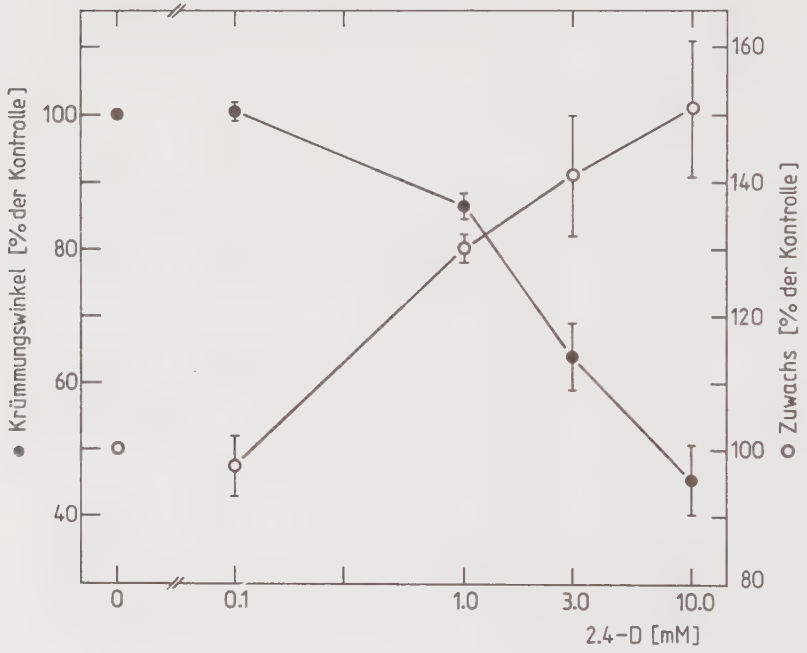


Abb. 11: Abhängigkeit der geotropischen Reaktion und des Längenwachstums bei Hafer-Internodiensegmenten von der Konzentration von 2,4-D. Die Inkubationszeit betrug 20 h. Die Daten sind Mittelwerte (± SEM) aus 4 Versuchsreihen mit je 9 Segmenten.

diskutiert (Rapoport et al., 1978). In eigenen Untersuchungen konnte festgestellt werde, daß 2,4-D das GA_3-Wachstum weniger reduziert als IAA. 2,4-D könnte ein nichtkompetitiver Inhibitor mit geringerer Affinität zum Rezeptormolekül sein.

Die negativ geotropische Reaktion ist die Folge eines differentiellen Wachstumsprozesses. Während der geotropischen Reizung wächst die Unterseite des Knotens stärker als die Oberseite. Die Reduzierung der geotropischen Krümmung bei Haferinternodien sich auf ein verstärktes Wachstum der oberen Knotenhälften zurückführen. Dies wurde in mikroskopischen Untersuchungen von Rapoport et al. (1978) und mit Messungen von Bridges und Wilkins (1973) gezeigt.

5.2. Geotropismus, Streckungswachstum und Auxinverteilung bei Haferkoleoptilen

5.2.1. Geotropismus und Streckungswachstum

Nachdem die Versuche an geosensitivem Knotengewebe von Haferinternodien eine deutliche Beteiligung von Auxin und GA_3 an der geotropischen Reaktion zeigten, wurde der Einfluß dieser Hormone auf die geotropische Krümmung bei Haferkoleoptilen untersucht.

Die Entscheidung, die Experimente mit Haferkoleoptilen fortzusetzen, hat folgende Gründe. Geprüft werden sollte, ob der an den Knoten gemessene Effekt von GA_3 und IAA auch an einem anderen negativ geotropisch reaktiven Organ des gleichen Untersuchungsobjektes beobachtet werden kann.

Die Untersuchung des Hormontransportes an Internodiensegmenten von Avena sativa ist durch die geringe Größe des Knotens und die Integration von nicht unmittelbar an der geotropischen Krümmung beteiligten Organen, wie Blattscheide und Internodium, im Bereich des Knotens erschwert. Die Isolierung des reaktiven Knotengewebes führte zu Verletzungen

und würde die Handhabbarkeit des Objektes so reduzieren, daß nicht ohne weiteres gleichzeitig Hormontransport und geotrope Krümmung gemessen werden können.

Die bereits zahlreich an Haferkoleoptilen durchgeführten Experimente zu Fragestellungen des Hormontransportes an geotropisch sensitiven Organen ließen dieses Untersuchungsobjekt für weitere Versuche geeignet erscheinen.

Die geringe mechanische Stabilität und der durch die dünne Kutikula geringe Verdunstungsschutz waren die Eigenschaften der Haferkoleoptilen, die im Gegensatz zu den Hafer-Internodiensegmenten, bestimmend für den Versuchsaufbau waren.

Dekapitierte Koleoptilsegmente wurden horizontal so an ihren apikalen Enden in Agarblöcken befestigt, daß eine freie Beweglichkeit des basalen Segmentteils gewährleistet war. IAA und GA_3 wurden in unterschiedlichen Konzentrationen durch diese Agarblöcke angeboten.

Außerdem wurden parallel Wachstumstests durchgeführt, bei denen die dekapitierten Koleoptilsegmente mit dem apikalen Segmentende nach oben in vertikaler Position fixiert waren. Die basalen Segmentteile hingen frei beweglich nach unten.

Die in der folgenden Abbildung gezeigten Daten sind Mittelwerte aus mehreren Einzelproben einer repräsentativen Untersuchung. Die Auswahl dieses Experimentes basiert auf der Grundlage einer Versuchsreihe mit mehreren Einzelproben je Testansatz, die den Trend des dargestellten Ergebnisses absichert.

Das Ergebnis eines Geotropismustestes, bei dem horizontal fixierten Segmenten 100 µM, 300 µM und 1 mM IAA angeboten wurde, zeigen Abb. 12 a. und b. Die Inkubationszeit betrug 16 h.

Eine signifikante Reduzierung der negativ geotropischen Krümmung ist bei 100 µM IAA zu sehen. Eine positiv geotropische Reaktion beobachtet man bei Proben mit 1,0 mM IAA. Einen Einfluß von IAA auf das Längenwachstum kann man bei IAA Konzentrationen von 0,1 mM und 0,3 mM an horizontal

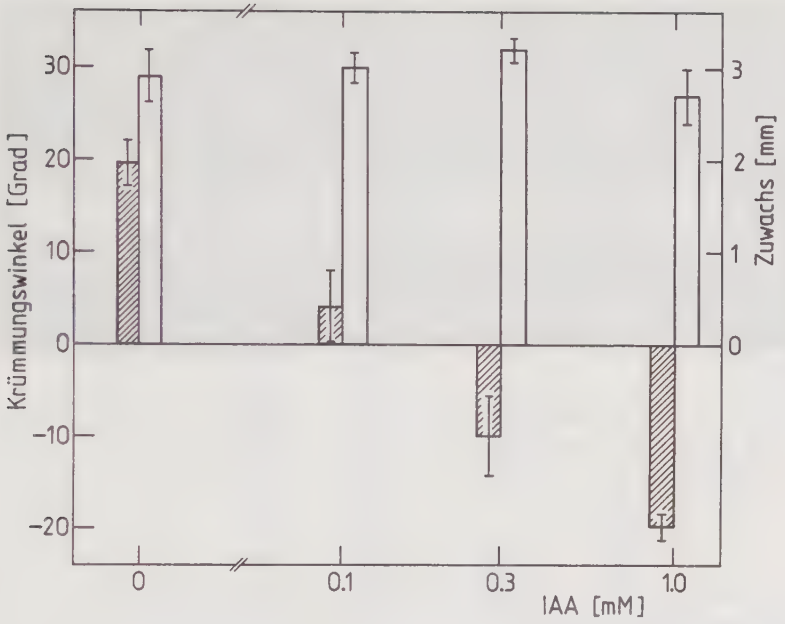


Abb. 12 a: Einfluß von Auxin auf die geotropische Reaktion und das Längenwachstum von dekapitierten Koleoptilsegmenten. Die Hafersegmente wurden am apikalen Ende horizontal in Agarblöcken befestigt, die unterschiedliche Auxinkonzentrationen erhielten. Die Inkubationszeit betrug 16 h. Die Daten sind Mittelwerte (±SEM) aus jeweils 5 Proben.

fixierten Segmenten im vorliegenden Test und im allgemeinen nicht feststellen. Eine Reduzierung des Längenwachstums bewirkt 1,0 mM IAA gegenüber Testansätzen mit 0,3 mM IAA, wenn auch in manchen Versuchen nicht signifikant.

Der Einfluß von GA_3 und IAA oder 2,4-D auf die geotropische Krümmung von Haferinternodien wurde in Kap. 5.1. beschrieben. Ob GA_3 und IAA in gleicher Weise an der geotropi-

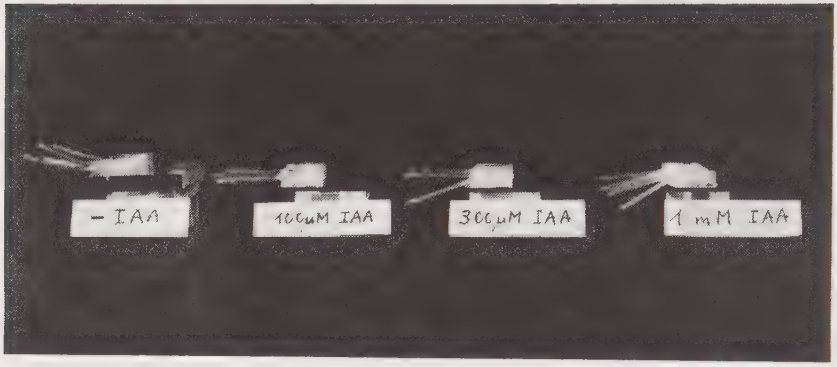


Abb. 12 b: Geotropische Reaktion von Haferkoleoptilen. Die Versuchsdurchführung erfolgte wie in Abb. 12 a beschrieben.

schen Reaktion von Haferkoleoptilen beteiligt sind, muß ein weiterer Versuch prüfen.

Wegen des polar basipetalen Transportes von IAA wurde der Donor am apikalen Ende der Haferkoleoptile angebracht. Dieser Agarblock diente auch als Donor für GA_3. Abb. 13 zeigt das Ergebnis eines Experimentes, in dem horizontalen Haferkoleoptilen 100 µM IAA und 300 µM GA_3 an den apikalen Schnittflächen angeboten wurde. Die Inkubationszeit betrug 27 h.

Die Ablenkung der Segmente liegt bei einer Konzentration von 300 µM GA_3 im Bereich des Kontrollansatzes. Die durch IAA reduzierte geotropische Reaktion bleibt auch bei einem gleichzeitigen Angebot von 300 µM GA_3 fast unverändert.

Um den Effekt von IAA auf das Längenwachstum vertikaler Segmente zu prüfen, wurden in den Donoren verschiedene IAA-Konzentrationen angeboten. Die Inkubationszeit betrug 18 h. Die Daten sind Mittelwerte aus 5 Versuchsreihen mit mehreren Segmenten pro Testansatz (Abb. 14). Die Proben mit IAA wurden auf die Kontrollen ohne Hormon normiert.

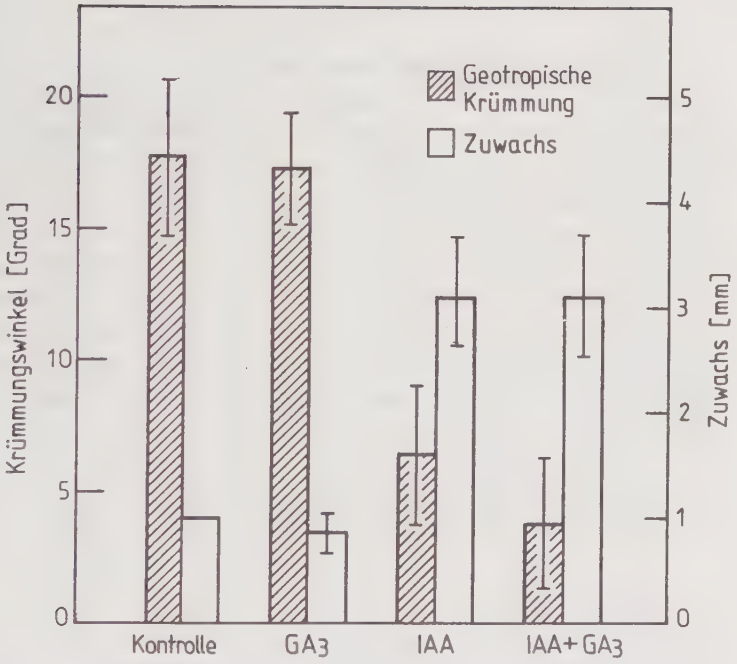


Abb. 13: Einfluß von GA_3 und IAA auf die geotrope Reaktion und auf das Längenwachstum von Koleoptilsegmenten. Die dekapitierten Avena Koleoptilsegmente wurden jeweils an ihrem apikalen Ende in einem Agarblock fixiert, der 100 µM IAA und/oder 300 µM GA_3 enthielt. Die Inkubationszeit betrug 27 h. Die Daten zeigen Mittelwerte (± SEM) von 6 bzw. 4 Proben je Ansatz.

Der Versuch zeigt ein Optimumsverhalten hinsichtlich der Abhängigkeit des Längenwachstums von der IAA-Konzentration. Eine signifikante Steigerung des Zuwachses ist bereits bei einem Donorangebot von 10 µM IAA zu beobachten. Der Bereich maximalen Längenzuwachses liegt bei 0,1 mM. Eine Erhöhung der IAA-Konzentration auf 1,0 mM führte zu einer Reduzierung

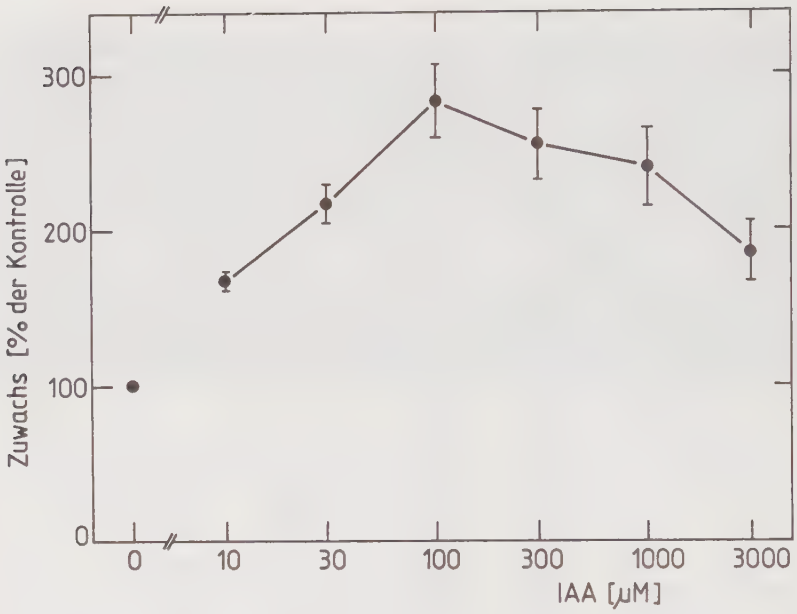


Abb. 14: Einfluß von Auxin auf das Längenwachstum von vertikal orientierten Koleoptilsegmenten. Dekapitierte Hafersegmente wurden in Agarblöcken fixiert, so daß das basale Ende nach unten zeigte. Die Inkubation dauerte 18 h. Die Daten sind Mittelwerte (±SEM) aus 5 Versuchsreihen mit mehreren Segmenten pro Testansatz.

des Wachstums. Der Segmentzuwachs konnte durch ein IAA-Angebot von 3,0 mM im Donor signifikant reduziert werden.

GA_3 beeinflußt weder das Grundwachstum noch das durch IAA-induzierte Wachstum (Abb. 13).

Der laterale Transport von Auxin in horizontalen Haferkoleoptilen von der Ober- zur Unterseite des sensitiven Organs ist in vielen Untersuchungen gezeigt worden (Brauner und Appel, 1960; Shaw et al., 1973). Nach dem Modell von Cholodny und Went zur geotropischen Reaktion resultiert aus

der asymmetrischen IAA-Verteilung ein differentielles Wachstum.

Die hier gezeigten Wachstumsmessungen mit vertikalen Haferkoleoptilsegmenten geben Hinweise auf ein Optimumverhalten des Zuwachses bezüglich der IAA-Konzentration wie es auch Tietze-Haß und Dörffling (1977) beobachtet haben. Die Daten der Geotropismus-Versuche deuten darauf hin, daß bei horizontalen Segmenten und bei hohem Auxinangebot im apikalen Donor aufgrund des Lateral- und verstärkten Longitudinaltransportes in der unteren Segmenthälfte überoptimale Auxinkonzentrationen erreicht werden könnten, die dort zu einer Reduzierung des Wachstums führen. In der oberen Hälfte des Segmentes wird das Wachstum gesteigert, so daß insgesamt eine Reduzierung der negativ geotropen Krümmung oder eine positiv geotrope Reaktion festgestellt werden kann.

5.2.2. Aufnahme und Transport von Auxin

Bei Haferkoleoptilen konnte eine deutliche Abhängigkeit der geotropischen Reaktion von der im Donor angebotenen IAA-Konzentration festgestellt werden. Weitere Experimente wurden daher unternommen, um die Aufnahme und den Transport von IAA in Haferkoeoptilen zu untersuchen. Zur Charakterisierung des Auxin-Transportes wurden dem Agar außer ^{14}C-IAA, das selbst eine Konzentration von 3,83 µM hatte, nicht markierte IAA zugesetzt.

Die Fixierung der Koleoptile und die Zuführung des Auxins erfolgte wie im Ansatz vorher. Nach der Inkubation wurde die Verteilung von IAA in den Koleoptilsegmenten durch Messung

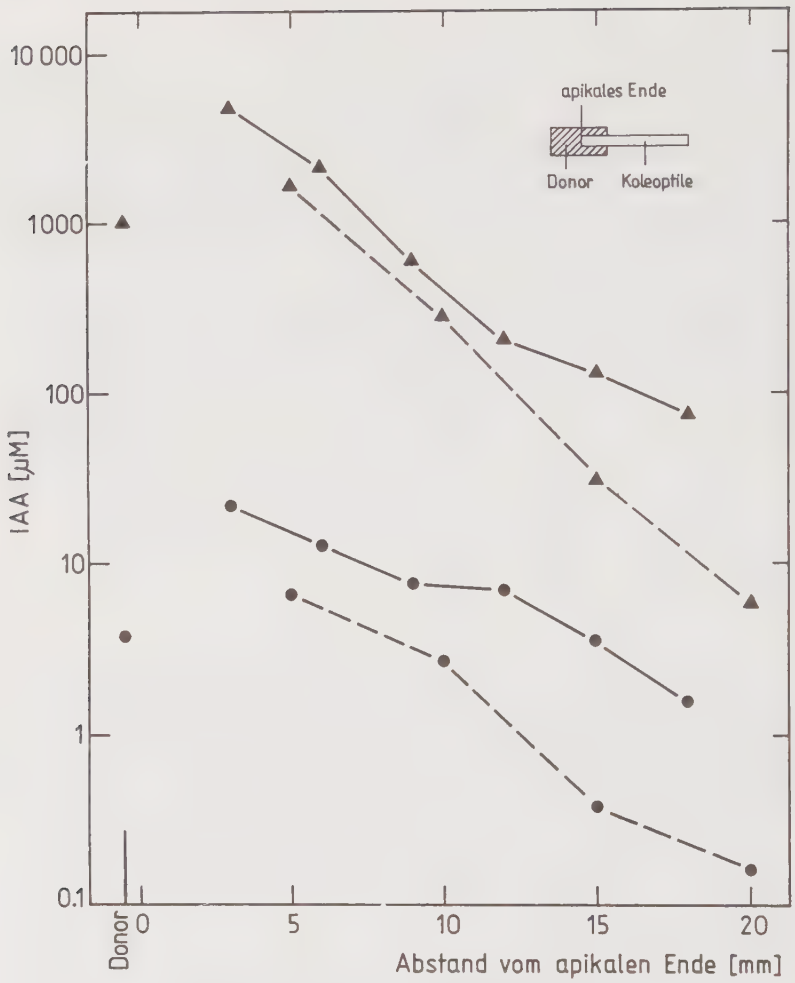


Abb. 15: Aufnahme und Transport von IAA in horizontalen Koleoptilsegmenten. Die dekapitierten Avena Koleoptilsegmente wurden jeweils an ihrem apikalen Ende in einem Agarblock fixiert, der entweder nur 3,83 µM ^{14}C-IAA (●) enthielt oder zusätzlich 1 mM IAA (▲). Die Inkubationszeit betrug 8 h (---) oder 24 h (——).

der Radioaktivität von ^{14}C-IAA bestimmt. Dazu war es notwendig, die Koleoptilen von den Donoren zu trennen und in gleich lange Segmente zu zerschneiden. Der in den Koleoptilsegmenten tatsächlich vorhandene wirksame Auxingehalt kann bei dieser Untersuchung nur in seiner Größenordnung erfaßt werden. Berücksichtigt werden muß, daß einerseits die endogene Auxinkonzentration unbekannt ist und andererseits das endogene wie das von außen angebotene Auxin infolge der Metabolisierung die Auxinaktivität verliert. Das 2-14-C-IAA bleibt auch nach einer Decarboxylierung radioaktiv und wird bei der Zählung miterfaßt.

Abb. 15 zeigt das Ergebnis eines Versuches, in dem 6 Segmente nach einer Inkubatinszeit von 8 h und weitere 6 Segmente nach einer Inkubationszeit von 24 h vom Donor getrennt wurden. Jeweils 3 Segmente bekamen ausschließlich markierte IAA angeboten, die anderen 3 Segmente erhielten die gleiche Konzentration markierte IAA und 1 mM nicht markierte IAA. Um eine Abschätzung der Auxinkonzentration in dem jeweils untersuchten Segment vornehmen zu können, wurde angenommen, daß das Hafer-Koleoptilsegment aus Wasser besteht und eine gleichmäßige Verteilung des angebotenen Hormons in der Zelle stattfindet. Aus der Radioaktivität des Koleoptilsegmentteils, dem Volumen dieses Segmentstückes und der spezifischen Aktivität des Auxins kann die Auxinkonzentration in den einzelnen Teilen des Koleoptilsegmentes ungefähr bestimmt werden.

Die jeweils vom apikalen Koleoptilende abgeschnittenen Segmentstücke (Nr. 1), die im Versuchsansatz fast mit der gesamten Oberfläche von Agar bedeckt waren, zeigen eine von der im Agarblock angebotenen IAA-Konzentration unabhängige IAA-Aufnahme. So konnte nach 8 h Inkubation im 1. Koleoptilsegment 70 % mehr Auxin gemessen werden als angeboten wurde, also 6,6 µM und 1,68 mM IAA bei Donorkonzentrationen von 3,83 µM bzw. 1,0 mM. Nach 24 h Inkubation stieg die IAA-Konzentration im apikalen Segment auf das 5 fache der Donorkonzentration.

D. DISKUSSION

Um einen möglichen Einfluß von GA_3 auf die Regulation der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration zu prüfen, wurden verschiedene zelluläre Transportmechanismen untersucht, die an der Aufnahme und Abgabe von Ca^{2+} beteiligt sein könnten.

Es wurden dazu Zucchini-Hypokotylsegmente mit $CaCl_2$, $^{45}Ca^{2+}$ und GA_3 inkubiert, in definierten Zeitabständen Proben entnommen und die Radioaktivität in den Segmenten gemessen. Zur Untersuchung der Abhängigkeit des aktiven Ca^{2+}-Transportes aus der Zelle von GA_3, wurde den Segmenten nach der Vorinkubation mit $CaCl_2$ und $^{45}Ca^{2+}$ EGTA und GA_3 zugesetzt.

Die Kinetik der Ca^{2+}-Aufnahme in das Gewebe zeigt während der Inkubationszeit keine konstante Aufnahmerate. Die hohe, GA_3-unabhängige Ca^{2+}-Aufnahmerate zu Inkubationsbeginn deutet auf eine Ca^{2+}-Aufnahme in die Zellwand hin. Die sich anschließende langsamere, GA_3-beeinflußte Ca^{2+}-Aufnahme läßt sich als Ca^{2+}-Aufnahme in die Zelle interpretieren. Die Ursache der statistischen Schwankungen bezüglich des Einflusses von GA_3 auf die Ca^{2+}-Aufnahme könnte an dem unterschiedlichen Volumen der Segmente bei verschiedenen Probenentnahmen liegen. Gerade bei kurzen Inkubationszeiten ist der Anteil des in der Zellwand gebundenen Calciums im Vergleich zum Gesamtcalcium des Segmentes hoch. Der eventuell von Probe zu Probe stark schwankende, durch GA_3 nicht beeinflußbare Ca^{2+}-Gehalt der Zellwand überlagert den Einfluß von GA_3 auf die Ca^{2+}-Aufnahme in die Zelle.

Die Abhängigkeit der Ca^{2+}-Aufnahmerate in die Zelle von GA_3 und die davon unbeeinflußte Aufnahme von Ca^{2+} in die Zellwand wurde in einem Experiment bestätigt, bei dem, zur Vermeidung der oben genannten Probleme, zu einem frühen und zu einem späten Entnahmezeitpunkt sehr viele unabhängige Proben entnommen wurden.

Versuche zur Untersuchung der Regulation der aktiven

Calcium-Abgabe durch GA_3 zeigten, daß die Ca^{2+}-Abgabe aus den Zellen durch GA_3 nicht beeinflußt wird.

Die Charakterisierung des Ca^{2+}-Transportes in das Gewebe ergab sowohl für die Aufnahme von Ca^{2+} in die Zellwand als auch in die Zelle ein Sättigungsverhalten. Man kann also festhalten, daß keine einfache Verteilung des Calciums zwischen Inkubationsmedium und Zellwand oder Protoplast stattfindet.

Die Ca^{2+}-Aufnahme in die Zellwand zeigt eine sättigbare und eine nichtsättigbare Komponente. Die Sättigbarkeit der Bindung mit einem K_D von ca. 160 µM ist ein Indiz für eine spezifische Wechselwirkung zwischen Calcium und Bindungsstelle. Die nichtsättigbare Aufnahme von Ca^{2+} bei höherem Ca^{2+}-Angebot bedeutet, daß eine Verteilung des Calciums zwischen Inkubationsmedium und Wandvolumen stattfindet.

Bei der Aufnahme von Ca^{2+} in den Apoplasten muß beachtet werden, daß Calcium hier funktionell nicht nur bei Bindungsstellen in der Zellwand, sondern auch als integraler Bestandteil der Plasmamembran eine Rolle spielt (Hanson, 1983).

Die Aufnahme von Calcium in die Zelle ist ein komplexer Prozess. Der apparente K_M-Wert ist aufgrund der Daten dieser Untersuchung größer als 1 mM anzunehmen. Ein hoher K_M-Wert bedeutet eine geringe Affinität des Ca^{2+} zur Bindungsstelle des Aufnahmemechanismus und damit eine niedrige Ca^{2+}-Aufnahme in die Zelle. Die geringe Affinität von Calcium zur Bindungsstelle wirkt einem Ausgleich des Calciumgradienten entgegen.

Die Erklärung der hohen Abgaberate von Ca^{2+} unmittelbar nach Zugabe von EGTA als eine Entfernung von Ca^{2+} aus der Zellwand ist konform mit der Interpretation von Moll und Jones (1981), daß die durch den Einsatz von Ca^{2+}-Komplexbildnern ausgelöste schnelle Wachstumsreaktion bei Salat-Hypokotylsegmenten auf eine Reduzierung der Ca^{2+}-Konzentration in der Zellwand zurückgeht.

Salat-Hypokotylsegmente sind GA_3 sensitiv. Sie zeigen bei Dunkelheit oder GA_3-Angebot ein gesteigertes Wachstum, das mit einer niedrigen Aktivität der Phenylalaninammoniumlyase (PAL) korreliert ist (Barnes und Jones, 1984).

Die in dieser Arbeit diskutierten Ergebnisse zeigen, daß bei Zucchinihypokotylen die PAL-Aktivität durch GA_3 oder Dunkelheit reduziert werden kann. Im Gegensatz zu Salat beobachtet man jedoch an Hypokotylen von Zucchini keine Abhängigkeit des Wachstums von GA_3.

Barnes und Jones (1984) stellten in Salat-Hypokotylen eine deutliche Verrringerung der PAL-Aktivität durch trans-Zimtsäure oder L-α-Aminooxy-ß-phenyl-propionsäure (L-AOPP) fest. Die Reduzierung der PAL-Aktivität blieb ohne Einfluß auf das Wachstum.

Es besteht daher nicht unbedingt ein direkter Zusammenhang zwischen dem Einfluß von GA_3 auf den Phenylpropanstoffwechsel, der mit Lignin einen wichtigen Bestandteil der Zellwand bereitstellt, und dem Längenwachstum (vgl. Fry, 1979).

Nach 26 h Inkubation konnte eine Reduzierung der PAL-Aktivität durch GA_3 festgestellt werden, die nach 1,5 h Inkubation nicht beobachtet wurde. Dies ist ein Indiz dafür, daß GA_3 nicht direkt, etwa als Inhibitor, die Aktivität des Enzyms beeinflußt, sondern regulierend in die de novo Synthese eingreift (vgl. Heinzmann und Seitz, 1977).

Ausgangspunkt der Untersuchung war es, die Aktivität der PAL bei einer veränderten intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration zu messen. Die Rolle von Ca^{2+} und GA_3 bei der Sekretion oder Synthese von α-Amylase aus Gersten Aleuronschichten wurde von Jones und Jacobsen (1983) und Jones und Carbonell (1984) geprüft.

In der vorliegenden Arbeit zeigten Versuche, in denen mit dem Calciumionophor A 23187 und dem Calciumkomplexbildner EGTA in einem calciumfreien Inkubationsmedium eine Erniedrigung der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration herbeigeführt wurde, eine Reduzierung der PAL-Aktivität. Dieses Ergebnis

ist in Übereinstimmung damit, daß ebenfalls bei Zucchinihypokotylen GA_3 sowohl die Ca^{2+}-Aufnahme als auch die PAL-Aktivität reduziert. Möglicherweise führt die durch GA_3 verminderte intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration zu einer Reduzierung der de novo Synthese von PAL.

Es ist vorstellbar, daß die Aufnahme des Ionophors bei Zucchinihypokotylen im Gegensatz zu isolierten Avena Internodien durch die Kutikula stark behindert ist und im wesentlichen nur über die Schnittflächen erfolgt, so daß ein Angebot von 10 nM A 23187 nicht zu einer signifikanten Erhöhung der Permeabilität für Ca^{2+} führt. Andererseits steigt durch den stark erniedrigten Ca^{2+}-Konzentrationsunterschied zwischen Cytoplasma und Wandraum die Aktivität der Ca^{2+}-Pumpe im Plasmalemma, so daß die Ca^{2+}-Konzentration im Cytoplasma ungefähr auf die Konzentration des Außenmediums reduziert werden könnte. Der Einsatz von A 23187 hat dann keinen Einfluß auf die Ca^{2+}-Verteilung zwischen Symplast und Apoplast.

Wachstumstests mit Hafer-Internodiensegmenten haben gezeigt, daß ausschließlich GA_3 zu einer Steigerung des Wachstums führt, und Abscisinsäure, Auxin und Kinetin als nichtkompetitive Inhibitoren das GA_3-induzierte Wachstum hemmen (Übersicht: Rapoport et al., 1978).

Der in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Test mit isolierten Internodien von Hafer bestätigt den wachstumsfördernden Einfluß von GA_3. Die Beobachtung, daß sowohl das Grundwachstum als auch das GA_3-induzierte Wachstum von 1-NAA in der gleichen Größenordunug reduziert wird wie von IAA, deutet auf die gleiche Bindungsstelle von IAA und 1-NAA und auf die gleiche biologische Wirksamkeit beider Auxine hin. 2-NAA kann jedoch IAA im Wachstumstest nicht ersetzen. 2-NAA reduziert das Grundwachstum und das GA_3-reduzierte Wachstum weniger, entweder aufgrund der geringeren Affinität zur Bindungsstelle oder der geringeren biologischen Wirksamkeit.

Bei der Untersuchung der Abhängigkeit des GA_3-induzierten Streckungswachstums von Hafer-Internodiensegmenten von der Ca^{2+}-Konzentration stellt man nur eine geringe Reduzierung des Zuwachses fest. Eine deutliche, von der Ca^{2+}-Konzentration abhängige Reduzierung des Wachstums findet man bei Einsatz des Calciumionophors X-537A.

Die von der Ca^{2+}-Konzentration unabhängige Reduzierung des Wachstums könnte auf eine Erhöhung der Wandstabilität durch zusätzliche Ca^{2+}-Brücken zurückzuführen sein. Moll und Jones (1981) zeigten bei Salathypokotylen eine Verminderung des Streckungswachstums durch Calciumaufnahme in die Zellwand. Man muß bei dem Vergleich der Daten berücksichtigen, daß Moll und Jones (1981) die Wachstumsrate mit einer Wegaufnehmer-Apparatur gemessen haben, und in der vorliegenden Arbeit Endpunktbestimmungen erfolgten. Der in dieser Untersuchung, nach einer Langzeitinkubation bestimmte, vergleichsweise geringe Einfluß von Ca^{2+} auf die Zellwand, umfaßt wahrscheinlich im Gegensatz zu Wachstumsmessungen in kurzen Zeitabständen (vgl. Moll und Jones, 1981) noch weitere an dem Streckungswachstum beteiligte Komponenten. Moll und Jones (1981) stellen die Hypothese auf, daß das Streckungswachstum eine Funktion der Calciumkonzentration der Zellwand ist, und daß GA_3 das Wachstum durch eine erhöhte Aufnahme von Ca^{2+} aus der Zellwand in die Zelle beeinflußt, so daß die verringerte Ca^{2+}-Konzentration in der Zellwand zu einer Steigerung der Wachstumsrate führt. Die Interpretation von Moll und Jones (1981) bietet keinen Erklärungsansatz dafür, wie GA_3 das in der Zellwand gebundene Ca^{2+} mobilisieren soll. Die Vermittlung des GA_3-induzierten Wachstums von Salat-Hypokotylsegmenten durch Protonensekretion in den Zellwandraum kann dabei ausgeschlossen werden, wie Untersuchungen von Stuart und Jones (1978) und Moll und Jones (1981) gezeigt haben. Ungeklärt ist außerdem, ob GA_3 überhaupt die Aufnahme großer Mengen von Calcium aus der Zellwand in die Zelle bewirken kann (vgl. Neumann und Jánossy, 1977).

Die in Gegenwart des Calciumionophors zu beobachtende Reduzierung des Streckungswachstums bei zunehmendem Ca^{2+}-Angebot deutet darauf hin, daß Calcium nicht nur eine Rolle bei der mechanischen Stabilisierung der Zellwand spielt. Es könnte auch an biochemischen Reaktionen beteiligt sein, die über eine Erhöhung der cytoplasmatischen Ca^{2+}-Konzentration zu einer Reduzierung des GA_3-induzierten Wachstums führen. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu der von Moll und Jones (1981) vorgeschlagenen Hypothese, daß GA_3-induziertes Wachstum durch die Aufnahme von Ca^{2+} in die Zelle induziert wird.

Versuche von Cleland und Rayle (1977) an Haferkoleoptilen zeigten, daß Calcium zu einer Verminderung der Extensibilität der Zellwand und des Säure-induzierten Wachstums führte. Dieses Ergebnis wird von Cleland und Rayle (1977) unter anderem so interpretiert, daß Calcium Proteine oder Polysaccharide so verändert, daß eine H^+-induzierte, enzymatische und die Zellwandstabilität herabsetzende Reaktion nicht stattfinden kann. Jedoch auch Moll und Jones (1981) schließen den Einfluß von indirekten Effekten nicht aus, beispielsweise von einem veränderten Ca^{2+}-Gradienten an der Plasmamembran durch die Entfernung von Ca^{2+} aus der Zellwand auf das Längenwachstum von Salathypokotylen.

Ein Vergleich der verschiedenen Ergebnisse zur Klärung der Rolle von Ca^{2+} bei GA_3-induziertem Wachstum ist problematisch, weil sich die verschiedenen Testsysteme in grundlegenden Eigenschaften unterscheiden. So zeigen GA_3-inkubierte Salat-Hypokotylsegmente keine erhöhte Protonensekretion, während dies bei Haferinternodien der Fall ist. Die Fähigkeit zur Protonensekretion ist insofern relevant, als Cleland und Rayle (1977) an Koleoptilen von Avena sativa eine deutliche Reduzierung des Säure-induzierten Wachstums in Gegenwart von $CaCl_2$ gezeigt haben. Andererseits ist es fraglich, ob Ergebnisse, die an Auxin-sensitvem Gewebe gefunden worden sind, als Hinweise zur Klärung des GA_3-induzierten Wachstums aufgegriffen werden können (vgl. Moll

und Jones, 1981).

Die Daten dieser Arbeit lassen sich dahingehend interpretieren, daß eine Erniedrigung der cytoplasmatischen Ca^{2+}-Konzentration eine Steigerung des GA_3-induzierten Wachstums bewirkt. Dieses Ergebnis ist konform mit dem Resultat, daß GA_3-induziertes Wachstum von Haferinternodien mit einer geringeren Ca^{2+}-Konzentration in den Segmenten korreliert ist und GA_3 in Zucchini-Hypokotylsegmenten zu einer Reduzierung der Ca^{2+}-Aufnahme führt.

Die Ergebnisse des Wachstumstestes zeigen, daß X-537A allein in der hier eingesetzten Konzentration von 30 nM wenig Einfluß auf das Wachstum hat. Weiterhin ist in den Proben mit und ohne Lasalocid eine von der angebotenen Mg^{2+}-Konzentration weitgehend unabhängige Beeinflußung des Wachstums festgestellt worden. X-537A ist ein Ionophor mit hoher Spezifität für Calcium gegenüber Magnesium. Eine regulatorische Funktion für Magnesium kann aufgrund des fehlenden Konzentrationsgradienten zwischen Cytosol und Außenmedium (Hepler und Wayne, 1985) ausgeschlossen werden.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß Magnesium vor allem als Strukturbestandteil oder als Cofaktor von Proteinen essentielle Voraussetzung für gesteigertes Wachstum ist, während wie bereits erwähnt, Calcium unterschiedliche Funktionen zur Reduzierung des Wachstums im Apoplasten und im Symplasten übernehmen kann.

Vergleichende Untersuchungen zeigten bei unilateraler Auxinapplikation an vertikalen Hafersegmenten und bei geotropisch gereizten Haferknoten ähnliche Reaktionen. Ein einseitiges Auxinangebot bei vertikalen Hafersegmenten führt zu einer Krümmung zur Seite ohne Hormonangebot. Diese Resultate deuten nach Dayanandan et al. (1976) darauf hin, daß Auxin ein natürlicher Wachstumsregulator der geotropischen Reaktion in Haferknoten ist.

In der vorliegenden Arbeit konnte an horizontalen Hafersegmenten mit GA_3 eine teilweise Aufhebung der Reduktion der

durch IAA reduzierten geotropischen Krümmung festgestellt werden. GA_3 allein beeinflußte dagegen nicht die geotropische Krümmung. Die Reduzierung der geotropischen Reaktion durch IAA oder 2,4-D ist bekannt und wird durch ein verstärktes Wachstum der oberen Segmenthälfte hervorgerufen (Dayanandan et al., 1976).

GA_3 könnte bei der Rekonstitution der durch IAA reduzierten Krümmung nichtkompetitiv mit Auxin wechselwirken und so das Auxin-induzierte Wachstum in der oberen Knotenhälfte reduzieren. Aufgrund der Spezifität von Hormon-Rezeptor-Beziehungen und dem chemisch unterschiedlichen Aufbau der Hormone Auxin und Gibberellinsäure ist eine kompetitive Wechselwirkung wohl auszuschließen.

Dayanandan et al. (1976) fanden, daß Knoten von vertikalen Haferinternodien bei einem Angebot von IAA und GA_3 ein Auxin-induziertes Wachstum zeigten und die Internodien einen Gibberellin-induzierten Zuwachs. Ein Effekt von GA_3 allein oder zusammen mit IAA auf das Wachstum von Knoten schien nicht nachweisbar. Ein Vergleich von Photographien, die das Ergebnis dokumentieren, zeigt jedoch eine deutliche Reduzierung des Auxin-induzierten Wachstums in Gegenwart von GA_3. Dieses Resultat bekräftigt an vertikal orientierten Hafersegmenten den bei geostimulierten Segmenten beobachteten Einfluß von GA_3 auf das IAA-induzierte Knotenwachstum.

Eine mögliche Beschränkung des Einflusses von GA_3 auf das IAA- oder 2,4-D induzierte Wachstum der oberen Knotenhälfte von horizontalen Segmenten steht im Einklang mit Untersuchungen von Bridges und Wilson (1973). Sie zeigten an horizontalen Segmenten der Blattschaftbasis von Weizen, daß eine unterschiedliche Auxinempfindlichkeit zwischen der oberen und der unteren Segmenthälfte besteht. Das Wachstum, das auch in kleinen Teilstücken des Segmentes induziert werden kann, hängt von der Orientierung des Gewebes im Schwerefeld ab. Durch 2 senkrecht zueinander stehende Schnitte in Längsrichtung des Segmentes wurde ein Segment in 4 Teilstücke unterteilt. Ein deutliches Wachstum ohne zuge-

führte Hormone konnte nur in horizontalen Segmentstücken festgestellt werden, deren äußere Epidermis nach unten zeigt. Diese Position wird als "geostimuliert" bezeichnet. Dagegen zeigen nur Gewebsstücke, deren äußere Epidermis nach oben gerichtet ist, sogenannte "nicht-stimulierte" Segmente, ein IAA-induziertes Wachstum. Andere geprüfte Hormone wie Kinetin oder GA_3 zeigten keinen Einfluß auf das Grundwachstum "geostimulierter" oder "nicht-stimulierter" Segmente. Die Beobachtung, daß die geostimulierten Segmentteilstücke gerade wuchsen, deutet nicht auf eine interne Umverteilung von Wuchsstoffen hin (Bridges und Wilson, 1973).

Außer der geotropischen Reaktion konnte an den geostimulierten Segmenten auch der Einfluß der Hormone auf den Zuwachs der Internodien gemessen werden.

Mit GA_3 inkubierte Segmente zeigten einen Zuwachs, der um ein Vielfaches über dem Grundwachstum lag. Auffallend war, daß IAA im Gegensatz zu 2,4-D keinen Zuwachs der Internodien bewirkte. Möglicherweise führt die geotropische Krümmung des apikalen Segmentteils zu einem Verlust der Hormonaufnahme in das Internodiensegment (Abb.1). Während von GA_3 nur ein vorübergehender kurzer Hormonimpuls genügt, um GA_3-induziertes Wachstum zu erhalten, ist ein permanentes Auxin-Angebot erforderlich, damit bei Auxin-sensitivem Gewebe die Wachstumsrate erhöht bleibt (Montague et al., 1973; Jones, 1980). Man könnte sich vorstellen, daß das kurzfristige Hormonsignal von GA_3 durch Proteinkinasen in dauerhafte kovalente Modifikationen umgesetzt wird, die auf das Wachstum Einfluß nehmen. Das Segment ist zu Versuchsbeginn vollständig mit Inkubationsmedium bedeckt. Die Hormonaufnahme ist aufgrund der dünnen Kutikula des Internodiums (Hebard et al., 1976) über die ganze Oberfläche des Internodiums möglich. Durch die geotropische Krümmung verringert sich die Kontaktfläche zwischen Internodium und Inkubationsmedium. Außerdem könnte als Folge der geotropischen Krümmung der Blattschaft den unmittelbaren Kontakt zum Inkubationsmedium verhindern (vgl. Abb.1).

Bei eingeschränkter Hormonaufnahme könnte der geringere basipetale Transport von 2,4-D gegenüber dem Transport von IAA in der Zellstreckungszone des Segmentes zu höheren Konzentrationen von 2,4-D führen. Bei nur vorübergehendem Auxin-Angebot könnte infolge des basipetalen Transportes von IAA der Hormongehalt des Gewebes soweit reduziert werden, daß das Wachstum verringert wird.

Eventuell zu berücksichtigen ist auch, daß 2,4-D im Vergleich zu Auxin nicht metabolisiert wird. Biologisch aktives 2,4-D steht damit länger als wachstumsförderndes Hormon zur Verfügung.

Bei der Untersuchung der Abhängigkeit der geotropischen Reaktion an dekapitierten Avena Koleoptilsegmenten von der IAA-Konzentration ist mit zunehmendem Auxinangebot eine Reduzierung der negativ geotropischen Krümmung zu beobachten. Höhere Auxinkonzentrationen führen zu einer positiv geotropischen Reaktion.

Die Abhängigkeit des Zuwachses vertikal orientierter dekapitierter Hafer-Koleoptilsegmente von der Auxinkonzentration zeigt einen glockenförmigen Kurvenverlauf. Im Bereich optimaler Auxinkonzentrationen findet man maximalen Zuwachs. Unterhalb dieses Bereiches findet man mit zunehmender Auxinkonzentration eine Steigerung des Zuwachses, darüber eine Reduzierung.

Auffallend ist, daß man bei geostimulierten Segmenten kein Auxin-induziertes Wachstum beobachten kann.

Die Annahme, daß eine überoptimale Auxin-Konzentration in der unteren Koleoptilhälfte geostimulierter Koleoptilen zu einer Reduzierung des Wachstums und damit der geotropischen Reaktion führen könnte, steht im Einklang mit den in dieser Arbeit parallel zu den Geotropismustests durchgeführten Wachstumstests und den Ergebnissen von Tietze-Haß und Dörffling (1977). Außerdem ist die Hypothese in Übereinstimmung mit dem bei Koleoptilen eindeutig nachgewiesenen Lateraltransport von Auxin (Goldsmith und Wilkins, 1964) und

dem früher für die geotropische Reaktion von Wurzeln diskutierten Modell von Cholodny und Went, nach dem eine überoptimale Auxinkonzentration auf der unteren Wurzelseite eine positiv geotropische Krümmung bewirken sollte. Neuere Experimente sprechen jedoch viel eher für die Umverteilung eines Auxin-regulierten Inhibitors, der Ethylen sein könnte. Abscisinsäure wird aufgrund zahlreicher Untersuchungen als möglicher Hemmstoff immer weniger diskutiert (Mulkey und Vaughan, 1986).

Festzuhalten bleibt, daß sowohl ein überoptimales Auxinangebot als auch ein Inhibitor auf der Unterseite des geostimulierten Organs zu einer Reduzierung der negativ geotropischen Reaktion führen kann.

Bei der Anwendung des Modells von Cholodny und Went auf die geotropische Reaktion von Koleoptilen wird vor allem die Bedeutung der Auxinakkumulation in der unteren Koleoptilhälfte für die negativ geotropische Krümmung hervorgehoben. Neuere Untersuchungen zeigen, daß die mit dem Lateraltransport ermöglichte Reduzierung des Auxingehaltes in der Oberseite, die dort zu einem verringerten Wachstum führt, ebenso wichtig für die Erklärung des Geotropismus ist (Hatfield und La Motte, 1985).

Die beobachtete Reduzierung der geotropischen Reaktion ist wahrscheinlich auf ein verändertes differentielles Wachstum zurückzuführen, das in erster Linie durch ein überoptimales Auxinangebot in der unteren Koleoptilhälfte und durch ein gesteigertes Wachstum in der oberen Koleoptilhälfte ausgelöst wird.

Ergebnisse von Brauner und Appel (1960) an geostimulierten Koleoptilen zeigen, daß neben dem Lateraltransport von Auxin das Eigenperzeptionsvermögen der Ober- und Unterseite von Koleoptilen wesentlich an der geotropischen Reaktion beteiligt sein kann. Die Beobachtung, daß die "geostimulierte" Unterseite anders auf ein Auxinangebot reagiert als die "nicht-stimulierte" Oberseite, konnten Bridges und Wilkins (1973) an Weizenknoten machen.

Die zusammengestellten Ergebnisse deuten darauf hin, daß der Schwerkraftreiz nicht nur einen Lateraltransport von Hormonen oder eine Hormonasymmetrie induziert. Möglicherweise wird auch die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber Hormonen, abhängig von der Orientierung des Gewebes, verändert (vgl. Brauner und Appel, 1960; Bridges und Wilkins, 1973; Hatfield und La Motte, 1985).

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente zeigen, daß man an geostimulierten Segmenten kein Auxin-induziertes Längenwachstum, aber ein gegenüber vertikalen Segmenten deutlich erhöhtes Grundwachstum beobachtet. Der größere Zuwachs horizontal fixierter Segmente könnte auf eine höhere Empfindlichkeit des Gewebes gegenüber dem endogenen Auxinangebot zurückgeführt werden. Die Annahme einer veränderten Hormonsensitivität bei geostimulierten Segmenten steht im Einklang mit den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen.

Sowohl das differentielle Wachstum der geotropischen Krümmung als auch das Längenwachstum von Avena Koleoptilen sind durch Auxin beeinflußbar. Dies schließt nicht aus, daß beide Prozesse unterschiedlich reguliert werden könnten. So kann die negativ geotropische Krümmungsreaktion durch Chlorpromazin gehemmt werden, ohne daß das Längenwachstum reduziert wird (Biro et al., 1982). Ein aktuelles, vorläufiges Modell für die Rolle von Calcium, Calmodulin, Auxin und die Protonenabgabe bei der geotropischen Reaktion gibt Pickard (1985).

Gibberellinsäure zeigte keinen Einfluß auf das Grundwachstum, das IAA-induzierte Längenwachstum oder das differentielle Wachstum geostimulierter Segmente.

Railton und Phillips (1973) fanden in horizontalen Koleoptilspitzen von Zea mays eine gegenüber vertikalen Koleoptilspitzen 5-fach höhere Menge von Gibberellinen. Außerdem konnte in geostimulierten Spitzen in den unteren im Vergleich zu den oberen Hälften ein deutlich höherer Gibberellin Gehalt gemessen werden. Die Experimente gaben auch

Hinweise dafür, daß ein möglicher Wachstumsinhibitor umgekehrt verteilt sein könnte wie die Gibberelline. Desgleichen konnte Kaufman et al. (1979) in den Knoten von geostimulierten Haferpflanzen den 7-fachen Gehalt an freier IAA gegenüber Knoten von senkrechten Pflanzen feststellen. Auch der Gehalt an Gibberellinsäure war in geostimulierten und nichtstimulierten Haferpflanzen in Knoten, Schaft und Internodium verschieden (Pharis et al., 1981).

Da bisher noch kein basipetaler Transport von GA_1 oder GA_3 festgestellt werden konnte, wird es für unwahrscheinlich gehalten, daß Railton und Phillips (1973) mit der Agarblockabfangmethode tatsächlich GA_1 oder GA_3 erfaßt haben (Haupt und Feinleib, 1979).

Um zu prüfen, ob ein Lateraltransport von Gibberellinen bei der geotropischen Reaktion von Koleoptilen zu der beobachteten Gibberellinsäureasymmetrie führt, ist es zunächst erforderlich, die verschiedenen im Gewebe vorkommenden Gibberelline eindeutig zu identifizieren. Erst dann lassen sich mit den passenden radioaktiv markierten Gibberellinen Fragen über die Beweglichkeit des Hormons und seine Rolle bei der geotropischen Reaktion klären.

Die Experimente, die zur Charakterisierung der Aufnahme und des Transportes von Auxin an horizontalen Koleoptilen durchgeführt wurden, zeigten in den apikalen Segmentteilen, die mit der gesamten Oberfläche von Agar bedeckt waren, eine im Verhältnis zur angebotenen IAA-Konzentration unabhängige IAA-Akkumulation. Die Voraussetzung für die Aufnahme und Anreicherung von Auxin in der Zelle ist nach der chemiosmotischen Hypothese zum polaren Transport von Auxin ein pH-Gradient über die Plasmamembran der Zelle (Goldsmith, 1977). Dabei erfolgt die Aufnahme des Auxins nach dem Ionenfallenprinzip. Der Aufnahmeprozess ist mindestens teilweise spezifisch und sättigbar. Der Austritt von Auxin aus der Zelle findet durch polar im Plasmalemma angeordnete Exit-Carrier statt. Der angenommene Primäreffekt von Auxin, die Erhöhung

der cytoplasmatischen Ca^{2+}-Konzentration, könnte nach Hertel (1983) indirekt die Protonensekretion steigern. Die verstärkte Ansäuerung des Außenmediums erleichtert die Auxinaufnahme.

Das in eigenen Experimenten beobachtete Sättigungsverhalten des IAA-Transportsystems steht im Einklang mit dem von Hertel (1983) aufgestellten Modell, nach dem nicht nur die Auxin-Aufnahme, sondern auch die Abgabe des Auxin spezifische und sättigbare Transportprozesse sind (vgl. Clark und Goldsmith, 1986).

Anzumerken bleibt, daß bei 1 mM Auxinangebot die Auxinkonzentration in dem ersten frei beweglichen apikalen Segmentteil horizontaler Koleoptilen in einer Größenordnung liegt, die sich, im Wachstumstest angeboten, im "Auxin-Wachstums-Diagramm" als überoptimal bezüglich des Längenwachstums herausstellte. In diesem Konzentrationsbereich ist ein zunehmendes Auxinangebot mit einer Reduzierung des Wachstums verbunden. In horizontalen Koleoptilen könnten also bei hohem Auxinangebot im Donor durch die Lateralverschiebung von Auxin in der unteren Koleoptilhälfte Konzentrationen erreicht werden, die gegenüber der oberen Koleoptilhälfte ein verringertes Längenwachstum induzieren. Eine Reduzierung der negativ geotropischen Reaktion wäre die Folge.

E. ZUSAMMENFASSUNG

An Hypokotylsegmenten von Zucchini wurde die Abhängigkeit der Ca^{2+}-Aufnahme und Abgabe von GA_3 mit Hilfe von $^{45}Ca^{2+}$ untersucht. Die Ca^{2+}-Aufnahmerate in das Gewebe ist unmittelbar nach Inkubationsbeginn am höchsten. Es folgt eine Phase langsamerer Ca^{2+}-Aufnahme. Die höhere Aufnahmerate geht auf eine Bindung an die Zellwand zurück, die niedrigere auf die Aufnahme in die Zelle. Durch den Chelatbildner EGTA konnte das in der Zellwand gebundene Calcium entfernt werden. Die Experimente zeigten, daß die Ca^{2+}-Aufnahme in die Zelle durch GA_3 reduziert wird, während die Aufnahme in die Zellwand oder oder der Transport aus der Zelle durch GA_3 nicht beeinflußt werden.

Am gleichen Gewebe konnte nachgewiesen werden, daß die Aktivität der Phenylalaninammoniumlyase (PAL) nach einer längeren Inkubation des Gewebes durch GA_3 reduziert und durch Licht erhöht wird. Eine Verringerung der PAL-Aktivität ließ sich auch durch den Einsatz von EGTA auslösen. Die durch GA_3 reduzierte de novo Synthese der PAL könnte auf eine verminderte cytoplasmatische Ca^{2+}-Konzentration zurückzuführen sein.

Messungen an isolierten Haferinternodien zeigten, daß Ca^{2+} allein das GA_3-induzierte Wachstum nur wenig reduziert, während eine deutliche von der Ca^{2+}-Konzentration abhängige Wachstumsverringerung bei Permeabilisierung der Plasmamembran durch X-537A festgestellt werden kann. Der Ionophor allein beeinflußte in der hier eingesetzten Konzentration (30 nM) das Längenwachstum nur unwesentlich. Die Daten lassen den Schluß zu, daß Calcium über eine Veränderung der cytoplasmatischen Ca^{2+}-Konzentration an der Regulation biochemischer Prozesse beteiligt ist. Dabei kann Magnesium Calcium funktionell nicht ersetzen.

Die geotropische Reaktion von Haferpflanzen findet in den Knoten statt. Sie wird durch IAA oder 2,4-D reduziert. Obwohl GA_3 allein keinen Einfluß auf die geotropische Reaktion hat, ließ sich mit GA_3 diese Verminderung der geotropischen Krümmung teilweise wiederaufheben. Diese Rekonstitution könnte auf eine nichtkompetitive Wechselwirkung zwischen Gibberellin und Auxin in der oberen Knotenhälfte zurückzuführen sein.

Die Messung des Längenwachstums vertikal orientierter Hafer-Koleoptilsegmente ergab ein Optimumverhalten bezüglich der angebotenen Auxinkonzentration. Die geotropische Reaktion der Koleoptilsegmente zeigte eine Reduzierung der negativ geotropischen Krümmung mit zunehmendem Auxinangebot. Das Auxin wurde in den Versuchen jeweils über die apikale Schnittfläche angeboten. An geostimulierten Segmenten konnte kein Auxin-induziertes Längenwachstum festgestellt werden. Sie zeigten aber ein gegenüber vertikal orientierten Segmenten deutlich erhöhtes Grundwachstum.

Die IAA-Konzentration in den Koleoptilsegmenten wurde mit Hilfe von markiertem Auxin gemessen. In dem ersten apikalen, eine positive geotropische Reaktion zeigenden Segmentteil horizontaler Koleoptilen wurde eine Auxinkonzentration festgestellt, die sich, im Wachstumstest angeboten, als überoptimal herausstellte.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß durch den Lateraltransport von Auxin in den unteren Hälften der Koleoptilen überoptimale Auxinkonzentrationen erreicht werden können. Diese führen zu einer Reduzierung der Wachstumsrate in der unteren gegenüber der oberen Koleoptilhälfte, und damit zu einer verringerten negativ geotropischen Krümmung bis hin zu einer positiven Reaktion.

F. LITERATUR

Adams, P.A., Kaufman, P.B., Ikuma, H.: Effects of gibberellic acid and sucrose on growth of oat (Avena) stem segments.
Plant Physiol. 51: 1102-1108 (1973)

Anderson, J.M., Cormier, M.J.: Calcium-dependent regulator of NAD kinase.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 84: 592-602 (1978)

Barnes, L., Jones, R.L.: Regulation of phenylalanine ammonia-lyase activity and growth in lettuce by light and gibberellic acid.
Plant, Cell and Environment 7: 89-95 (1984)

Baulcombe, D.C., Buffard, D.: Gibberellic-acid-regulated expression of α-amylase and six other genes in wheat aleurone layers.
Planta 157: 493-501 (1983)

Berridge, M.J.: Die Signalübertragung in die Zelle.
Spektrum der Wissenschaft, Dezember 1985, 136-146

Biro, R.L., Hale II, C.C., Wiegand, O.F., Roux, S.J.: Effects of chlorpromazine on gravitropism in Avena coleoptiles.
Ann. Bot. 50: 735-747 (1982)

Bradford, M.: A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
Analytical Biochemistry 72: 248-254 (1976)

Brauner, L., Appel, E.: Zum Problem der Wuchsstoff-Querverschiebung bei der geotropischen Induktion.
Planta 55: 226-234 (1960)

Bridges, I.G., Wilkins, M.B.: Growth initiation in the geotropic response of the wheat node.
Planta (Berl.) 112: 191-200 (1973)

Buckhout, T.J.: ATP-dependent Ca^{2+} transport in endoplasmic reticulum isolated from roots of Lepidum sativum L.
Planta 159: 84-90 (1983)

Carafoli, E., Penniston, J.T.: Das Calcium-Signal.
Spektrum der Wissenschaft, Januar 1986, 76-85

Cheung, W.Y.: Calmodulin.
Scientific American 246: 48-56 (1982)

Cholodny, N.: Wuchshormone und Tropismen bei den Pflanzen.
Biolog. Zentralblatt 47: 604-626 (1927)

Clark, K.A., Goldsmith, M.H.M.: Roles of transport and binding in the specific delta-pH-dependent accumulation of auxin by zucchini membrane vesicles.
In: Plant Growth Substances 1985, ed. M. Bopp, 203-208. Springer-Verlag, Berlin (1986)

Cleland, R.E., Rayle, D.L.: Reevaluation of the effect of calcium ions on auxin-induced elongation.
Plant Physiol. 60: 709-712 (1977)

Dayanandan, P., Hebard, F.V., Kaufman, P.B.: Cell elongation in the grass pulvinus in response to geotropic stimulation and auxin application.
Planta (Berl.) 131: 245-252 (1976)

De Guzman, C.C., dela Fuente, R.K.: Polar calcium flux in sunflower hypocotyl segments.
Plant Physiol. 76: 347-352 (1984)

Dela Fuente, R.K.: Role of calcium in the polar secretion of indoleacetic acid.
Plant Physiol. 76: 342-346 (1984)

Dieter, P., Marmé, D.: Calmodulin activation of plant microsomal Ca^{2+} uptake.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 7311-7314 (1980 a)

Dieter, P., Marmé, D.: Ca^{2+} transport in mitochondrial and microsomal fractions from higher plants.
Planta 150: 1-8 (1980 b)

Dörffling, K.: Das Hormonsystem der Pflanzen.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York (1982)

Fry, S.C.: Phenolic components of the primary cell wall and their possible role in the hormonal regulation of growth.
Planta 146: 343-351 (1979)

Goldsmith, M.H.M.: The polar transport of auxin.
Ann. Rev. Plant Physiol. 28: 439-478 (1977)

Goldsmith, M.H.M., Wilkins, M.B.: Movement of auxin in coleoptiles of Zea mays L. during geotropic stimulation.
Plant Physiol. 39: 151-162 (1964)

González, E., Delsol, M.A.: Induction of glyconeogenic enzymes by gibberellin A_3 in endosperm of castor bean seedlings.
Plant Physiol. 67: 550-554 (1981)

Gross, J., Marmé D.: ATP-dependent Ca^{2+} uptake into plant membrane vesicles.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 1232-1236 (1978)

Gross, J.: Oxalate-enhanced active calcium uptake in membrane fractions from zucchini squash.
In: Plasmalemma and Tonoplast: Their Functions in the Plant Cell, ed. D. Marmé, E. Marrè, R. Hertel, 369-376.
Elsevier Biomedical Press, Amsterdam (1982)

Hager, A., Menzel, H., Krauss, A.: Versuche und Hypothese zur Primärwirkung des Auxins beim Streckungswachstum.
Planta (Berl.) 100: 47-75 (1971)

Halstead, T.W.: Plant gravitational and space research.
In: Workshop Summaries III, American Society of Plant Physiologists, T.W. Halstead, Chairman.
Waverly Press, Baltimore, Maryland (1984)

Hanson, J.B.: The roles of calcium in plant growth.
In: Current Topics in Plant Biochemistry and Physiology, ed. D.D. Randall, D.G. Blevins, R. Larson. Missouri, Columbia (1983)

Hatfield, R.D., La Motte, C.E.: Gravitropic responses of partially decapitated corn coleoptiles with and without applied ^{14}C indoleacetic acid.
Plant Physiol. 77: 475-480 (1985)

Hebard, F.V., Amatangelo, S.J., Dayanandan, P., Kaufman, P.B.: Studies on acidification of media by Avena stem segments in the presents and absence of gibberellic acid.
Plant Physiol. 58: 670-674 (1976)

Heinzmann, U., Seitz, U.: Synthesis of phenylalanine ammonia-lyase in anthocyanin-containing and anthocyanin-free callus cells of Daucus carota L. Planta 135: 63-67 (1977)

Hepler, P.K., Wayne, R.O.: Calcium and plant development. Ann. Rev. Plant Physiol. 36: 397-439 (1985)

Hetherington, A., Trewawas, A.: Calcium-dependent protein kinase in pea shoot membranes. FEBS Lett. 145: 67-71 (1982)

Hertel, R.: The mechanism of auxin transport as a model for auxin action. Z. Pflanzenphysiol. 112: 53-67 (1983)

Jones, R.L.: Gibberellins: their physiological role. Ann. Rev. Plant Physiol. 24: 571-598 (1973)

Jones, R.L.: The physiology of gibberellin-induced elongation. In: Plant Growth Substances, ed. F. Skoog, 188-195. Springer-Verlag, Berlin (1980)

Jones, R.L., Carbonell, J.: Regulation of the synthesis of barley aleurone α-amylase by gibberellic acid and calcium ions. Plant Physiol. 76: 213-218 (1984)

Jones, R.L., Jacobsen, J.V.: Calcium regulation of the secretion of α-amylase isoenzymes and other proteins from barley aleurone layers. Planta 158: 1-9 (1983)

Jusaitis, M., Paleg, L.G., Aspinall, D.: Correlation between the lipid composition and the responsiveness of Avena sativa stem segments to gibberellic acid. Plant Physiol. 70: 1486-1494 (1982)

Kaufman, P., Ghosheh, N.S., Pharis, R.P., Legge, R., Morf, W.: Metabolism of ^{3}H-GA_4 in geostimulated and upright shoots of oat plant (Avena sativa). Plant Physiol. 63: 174 (1979)

Kaufman, P.B., Bandurski, R., Dayanandan, P., Koning, R., Harrison, M.: Hormonal regulation of the negative geotropic response in Avena shoots. Plant Physiol. 63: 790 (1979)

Keith, B., Foster, N.A., Bonettemaker, M., Srivastava, L.M.: In vitro gibberellin A_4 binding to extracts of cucumber hypocotyls. Plant Physiol. 68: 344-348 (1981)

Keith, B., Srivastava, L.M.: In vivo binding of gibberellin A_1 in dwarf pea epicotyls. Plant Physiol. 66: 962-967 (1980)

Klumpp, S., Schultz, J.E.: Calcium und Calmodulin. Pharmazie in unserer Zeit, Nr.1 1985, 19-26

Kubowicz, B.D., Vanderhoef, L.N., Hanson, J.B.: ATP-dependent calcium transport in plasmalemma preparations from soybean hypocotyls. Plant Physiol. 69: 187-191 (1982)

Lee, J.S., Evans, M.L.: Polar transport of auxin across gravistimulated roots of maize and its enhancement by calcium. Plant Physiol. 77: 824-827 (1985)

Marmé, D.: Calcium, Calmodulin und ihre zelluläre Funktion. Biologie in unserer Zeit, Nr. 3 1981, 71-77

Marmé, D.: The role of Ca^{2+} in signal transduction of higher plants. In: Plant Growth Substances, ed. P.F. Wareing, 419-426. Academic Press, London (1982)

Marmé, D.: Calcium transport and function. In: Inorganic Plant Nutrition. Encyclopedia of Plant Physiology (NS), ed. A. Lauchli, R.L. Bielski, 15 B: 599-625. Springer Verlag, Berlin (1983)

Matthew, E.K.: Calcium translocation and control mechanism for endocrine secretion. Symp. Soc. Exp. Biol. 33: 225-249 (1979)

Mertens, R., Weiler, E.W.: Kinetic studies on the redistribution of endogenous growth regulators in gravireacting plant organs. Planta 158: 339-348 (1983)

Migliaccio, F., Rayle, D.L.: Sequence of key events in shoot gravitropism. Plant Physiol. 75: 78-81 (1984)

Moll, C., Jones, R.L.: Calcium and gibberellin-induced elongation of lettuce hypocotyl sections. Planta 152: 450-456 (1981)

Montague, M.J., Ikuma, H., Kaufman, P.B.: On the nature of physiological responses of Avena stem segments to gibberellic acid treatment. Plant Physiol. 51: 1026-1032 (1973)

Mulkey, T.J., Kuzmanoff, K.M., Evans, M.L.: Promotion of growth and hydrogen ion efflux by auxin in roots of maize pretreated with ethylene biosynthesis inhibitors.
Plant Physiol. 70: 186-188 (1982)

Mulkey, T.J., Vaughan, M.A.: Auxin and root gravitropism: the state of our knowledge.
In: Plant Growth Substances 1985, ed. M. Bopp, 241-246. Springer-Verlag, Berlin (1986).

Muto, S., Miyachi, S.: Properties of a protein activator of NAD kinase from plants.
Plant Physiol. 59: 55-60 (1977)

Neumann, D., Jánossy, A.G.S.: Early responses to gibberellic acid in a dwarf maize mutant (*Zea mays* L. d_1).
Planta 137: 25-28 (1977)

Nobel, P.S.: Calcium uptake, ATPase and photophosphorylation by chloroplasts *in vitro*.
Nature (London) 214: 875-877 (1967)

Pharis, R.P., Legge, R.L., Noma, M., Kaufman, P.B., Ghosheh, N.S., LaCroix, J.D., Heller, K.: Changes in endogenous gibberellins and metabolism of ^{3}H-GA_3 after geostimulation in shoots of the oat plant (*Avena sativa*).
Plant Physiol. 67: 892-897 (1981)

Phillips, I.D.J.: Endogenous gibberellin transport and biosynthesis in relation to geotropic induction of excised sunflower shoot-tips.
Planta (Berl.) 105: 234-244 (1972)

Pickard, B.G.: Roles of hormones, protons and calcium in geotropism.
In: Hormonal Regulation of Development III. Encyclopedia of Plant Physiology (NS), ed. R.P. Pharis und D.M. Reid, 11: 193-281. Springer-Verlag, Berlin (1985)

Rapoport, E.N., Heller, K.E., Dayanandan, P., Hebard, F.V., Kaufman, P.B.: Role of indole-3-acetic acid and gibberellin in the control of internodal elongation in Avena stem segments.
Plant Physiol. 62: 807-811 (1978)

Rayle, D.L., Cleland, R.: Control of plant cell enlargement by hydrogen ions.
Curr. Top. in develop. Biology 11: 187-214 (1977)

Salimath, B.P., Marmé, D.: Protein phosphorylation and its regulation by calcium and calmodulin in membrane fractions from zucchini hypocotyls.
Planta 158: 560-568 (1983)

Sauter, M.: Wechselwirkungen von Ca^{2+} und IAA in vivo und in vitro.
Diplomarbeit, Tübingen (1984)

Shaw, S., Gardner, G., Wilkins, M.B.: The lateral transport of IAA in intact coleoptiles of Avena sativa L. and Zea mays L. during geotropic stimulation.
Planta (Berl.) 115: 97-111 (1973)

Slocum, R.D., Roux, S.J.: Cellular and subcellular localization of calcium in gravistimulated oat coleoptiles and its possible significance in the establishment of tropic curvature.
Planta 157: 481-492 (1983)

Stoddart, J.L.: Relationships between gibberellins and enzyme activity in various plant organs.
In: Hormonal Regulation in Plant Growth and Development. Proc. Adv. Study Inst. Izmir 1971, ed. H. Kaldewey, Y. Vardar, 189-205.
Verlag Chemie, Weinheim (1972)

Stoddart, J.L.: Gibberellin perception and its primary consequences.
In: Plant Growth Substances, ed. P.F. Wareing, 131-140. Academic Press, London (1982)

Stoddart, J.L., Venis, M.A.: Molecular and subcellular aspects of hormone action. In: Hormonal Regulation of Development I. Encyclopedia of Plant Physiology (NS), ed. J. MacMillan, 9: 445-510.
Springer Verlag, Berlin (1980)

Stuart, D.A., Jones, R.L.: The role of acidification in gibberellic acid-and fusicoccin-induced elongation growth of lettuce hypocotyl sections.
Planta 142: 135-145 (1978)

Tietze-Haß, E., Dörffling, K.: Initial phases of indoleacetic acid induced growth in coleoptile segments of Avena sativa L.
Planta 135: 149-154 (1977)

Vanderhoef, L.N., Kosuge, T.: The molecular biology of plant hormone action research directions.
In: Workshop Summaries III, American Society of Plant Physiologists.
Rockville, Maryland (1984)

Went, F.W.: Wuchsstoff und Wachstum.
Rec. Trav. Bot. Neerl. 25: 1-116 (1928)

Wilkins, M.B.: Growth-control mechanisms in gravitropism.
In: Physiology of Movements. Encyclopedia of Plant Physiology (NS), ed. W. Haupt, M.E. Feinleib, 7: 601-626 Springer-Verlag, Heidelberg (1979)

Wood, A., Paleg, L.G.: The influence of gibberellic acid on the permeability of model membrane systems.
Plant Physiol. 50: 103-108 (1972)

Wright, L.Z., Rayle, D.L.: Evidence for a relationship between H^+ excretion and auxin in shoot gravitropism.
Plant Physiol. 72: 99-104 (1983)

Zähringer, U., Ebel, J., Grisebach, H.: Induction of phytoalexin synthesis in soybean.
Archives of Biochemistry and Biophysics 188: 450-455 (1978)

Zucker, M.: Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue.
Plant Physiol. 40: 779-784 (1965)

Lebenslauf

Name:	Andreas Alfred Leuschke
Geburtstag, Geburtsort:	14.06.57 in Trier
Eltern:	Alfred Leuschke und Anni, geb. Schulze
Schule:	1964 - 1967 Grundschule in Oberndorf/Neckar 1967 - 1976 Gymnasium Oberndorf
Reifeprüfung:	25. Mai 1976
Wehrdienst:	1976 - 1977
Studium:	WS 1977/78 - WS 82/83 Biologie und Geographie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
Prüfungen:	1982 Staatsexamen in Geographie 1983 Staatsexamen in Biologie
Wiss. Arbeit:	WS 1981/82 - SS 82 am Geographischen Institut der Universität Tübingen, unter Anleitung von Prof. Dr. Chr. Hannß mit dem Thema: "Ökosystem Korallenriff - Ein Erklärungsansatz für die Verbreitung, Produktivität und Gefährdung von Korallenriffen"
Dissertation:	Seit Sept. 1983 am Institut für Biologie I, Universität Tübingen, unter Anleitung von Prof. Dr. A. Hager mit dem Thema: "Gibberellin und Auxin: Regulation des Calciumhaushaltes und Rolle beim Geotropismus". Seit WS 1983/84 Wissenschafliche Hilfskraft am Institut für Biologie I, Universität Tübingen

Meine akademischen Lehrer waren:

Ammermann, Anke, Bentrup, Berthold, Blume, Braun, Bunke, Drumm, Engels, Erkert, Grees, Grell, Gross, Haas, Hager, Hanack, Hannß, Karger, Kohlhepp, Kulzer, Lange, Lippmann, Loeschke, Mayer, Neugebauer, Rähle, Rundel, Schröder, Schwarz, Schwemmle, Seitz, Seyffert, Strähle, Suhr, Vogel, Westphal, Weisskirchner, Winkelmann

Besonders danken möchte ich Herrn Dr. J. Gross für die wissenschaftliche Betreuung, seine ständige Diskussionsbereitschaft, wertvollen Ratschläge und Kritik.

Herrn Prof. Dr. A. Hager gilt mein Dank für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes.

Druck und Verarbeitung: Dissertations Druck Darmstadt, Tel. 06151/21353